

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS – FCAT  
CAMPUS DE DRACENA**

**APOPTOSE EM PLACENTÔNIOS BOVINOS DE GESTAÇÕES DE CONCEPTOS  
NATURAIS E DE TRANSGÊNICOS CLONADOS**

**Bruna de Oliveira Vasconcelos**  
Bióloga

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS – FCAT  
CAMPUS DE DRACENA**

**APOPTOSE EM PLACENTÔNIOS BOVINOS DE GESTAÇÕES DE CONCEPTOS  
NATURAIS E DE TRANSGÊNICOS CLONADOS**

**Bruna de Oliveira Vasconcelos**

**Orientadora: Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira**

**Dissertação apresentada a  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Tecnológicas – FCAT- Unesp -  
Campus de Dracena, como parte  
das exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia Animal**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

V331a

Vasconcelos, Bruna de Oliveira.

Apoptose em placentônios bovinos de gestações de conceptos naturais e de transgênicos clonados / Bruna de Oliveira Vasconcelos.

-- Dracena: [s.n.], 2016.

57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2016.

Orientador: Flávia Thomaz Verechia Pereira

Inclui bibliografia.

1. Apoptose. 2. Transgenia. 3. Clonagem. 4. Bovinos. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Apoptose em placentônios bovinos de gestações de conceptos naturais e de transgênicos clonados

**AUTOR: BRUNA DE OLIVEIRA VASCONCELOS**

**ORIENTADOR: FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

*Flávia Thomaz Verechia Pereira*

Prof. Dr. FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

*Richard da Fonseca*

Prof. Dr. RICARDO DA FONSECA

Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

*Márcia Rita Fernandes Machado*

Profa. Dra. MÁRCIA RITA FERNANDES MACHADO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – FCAV – Câmpus de Jaboticabal

Ilha Solteira: 23 de fevereiro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Bruna de Oliveira Vasconcelos – nascida em 19 de dezembro de 1990, na cidade de Dracena/SP – Brasil, filha de Maria Cleuza de Oliveira Vasconcelos e Hamilton Cunha Vasconcelos. Em março de 2013, concluiu a graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, UFMS – Brasil. Em março de 2014, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa Inter unidades entre a Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT, Campus de Dracena e Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS, realizando estudos na área de “Morfofisiologia da Placenta e Embrião de Ruminantes”.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável!”

*Galileu Galilei*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Hamilton Cunha Vasconcelos e Maria Cleuza de Oliveira Vasconcelos pelo amor e apoio infinito a todas as minhas escolhas, dilemas e choradeiras. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos: Dudu e Nando, as crianças mais carinhosas e meigas que Deus me proporcionou conviver. Pelos abraços apertados e beijos babados nos momentos difíceis.

Com todo amor, a vocês dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, criador de todas as coisas.

Aos meus pais, apoio emocional e financeiro incondicional para conclusão deste trabalho. Serei eternamente grata por tudo que vocês abdicaram para que eu realizasse meu sonho.

Aos meus familiares, em especial a minha irmã Natália pela força e puxões de orelha.

À minha orientadora Professora Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira pelos valiosos ensinamentos ministrados que me proporcionaram amadurecer tanto na vida pessoal quanto acadêmica. Levarei seu exemplo para sempre.

Às valiosas amigadas que trouxe e às que fiz durante o mestrado: Camila (meu segundo encéfalo), Pricila, Gabriela (Mixis) e Rafael (Frei). Sem vocês não teria sido possível sobreviver às exaustivas etapas que resultaram nesse trabalho, seremos sempre a 'ala psiquiátrica' do programa. Obrigada pelas risadas, ombros pra chorar, caronas, almoços, abrigo e orações.

À equipe do L@mpe – Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião: Fernanda, Gabriela e Vítor que em momentos diferentes tornaram a permanência no laboratório menos solitária. Estendo meus agradecimentos aos amigos técnicos: Wanderson, Mirian, Ariane e Marcelo que me ensinaram a não explodir nada.

Aos funcionários da Unesp – Dracena pela amizade, carinho e apoio, em especial ao Marco pela carona mais que valiosa e por emprestar os ouvidos sempre pacientemente durante 160 kms diários. Você jamais saberá o quanto economizei de terapia graças a você.

Ao Professor Dr. Danilo Domingues Millen por gentilmente ceder os anticorpos que possibilitaram minhas análises. Muito Obrigada!



Ao Fernando, pelo carinho, paciência e apoio tanto comigo quanto com as imagens deste trabalho. Com você a jornada da pós - graduação se tornou mais colorida.

Meus sinceros agradecimentos à Unesp e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal das unidades de Ilha Solteira e Dracena, por todo apoio e profissionalismo.

E por fim, a todos que me encorajaram a concluir essa etapa, independente as adversidades enfrentadas. Não serei capaz de citar todos, mas sintam-se abraçados por mim.

**SUMÁRIO**

<b>CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Útero, Placenta e Placentônio .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Modelos Experimentais: Clonagem e Transgenia.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Apoptose.....</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Embriões Recombinantes que Expressam a Proteína Fluorescente Verde e Embriões Controle .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Técnica de Imunoistoquímica para Verificação da Apoptose – M30 CytoDEATH .....</b>	<b>32</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Dracena  
Faculdade de Zootecnia

**Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão da proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de células de origem fetal em gestações de clones bovinos", protocolo nº 002/2006, sob a responsabilidade da Profa Dra Flávia Thomaz Verechia Pereira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Zootecnia da Unesp Dracena.

(We certify that the Project "Expression of the green fluorescent protein (GFP) how marker of the cells of fetal origin in cloned cattle gestation", protocol number 002/2006, under the responsibility of the Dr Flávia Thomaz Verechia Pereira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethics in Animal Research Committee of the Faculty of Zootecny of Unesp Dracena).

Dracena, 11 de abril de 2006

Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto

Membro da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Profa Dra Flávia Thomaz Verechia Pereira

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Unesp Dracena

Rod. Com. João Ribeiro de Barros (SP 294) km 651 - Dracena - SP CEP: 17900-000

Fone: (13) 3021-0300 Fax: (13) 3021-0300

## **APOPTOSE EM PLACENTÔNIOS BOVINOS DE GESTAÇÕES DE CONCEPTOS NATURAIS E DE TRANSGÊNICOS CLONADOS**

### **RESUMO**

A placenta dos mamíferos é um órgão transitório formado pela justaposição entre os tecidos maternos e fetais, sendo responsável pelas trocas fisiológicas entre a mãe e o feto e pela síntese de hormônios fundamentais para a manutenção da gestação. Para o crescimento placentário e a nutrição fetal é necessário um delicado equilíbrio entre proliferação e morte das células placentárias. Essas células possuem propriedades específicas em relação a suas funções metabólicas, endócrinas e angiogênicas sendo fundamentais para o desenvolvimento adequado do concepto ao longo da prenhez e seu nascimento. Gestações de animais clonados frequentemente apresentam anormalidades como hidroâmnio, hidroalantoide, edema placentário, retenção de placenta e abortos. Neste estudo, foi avaliada a ocorrência de apoptose (morte celular) em placentônios provenientes de conceptos bovinos transgênicos clonados (n=5) e de gestações naturais (n=18), nos períodos de 60 e 90 dias de gestação, que tiveram seu desenvolvimento interrompido para remoção do útero gestante. As amostras de placentônio foram segmentadas e fixadas em solução aquosa de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M e pH 7.4, para verificação da morfologia pela coloração HE e realização da técnica de imunistoquímica. Os resultados obtidos foram comparados entre bovinos clonados transgênicos e de gestações naturais. Todos os grupos e idades gestacionais analisados apresentaram a mesma composição celular com epitélio uterino simples cúbico onde nota-se a presença de células trofoblásticas gigantes mononucleadas e células trofoblásticas gigantes binucleadas migradas do epitélio fetal, estroma endometrial bem desenvolvido, epitélio trofoblástico com células cuboides típicas de epitélio e quantidade acentuada de células trofoblásticas gigantes e gigantes binucleadas migrando para o epitélio materno e mesênquima. Em todos os grupos e períodos gestacionais, o epitélio materno apresentou maior marcação positiva para apoptose. Aos 60 dias a marcação positiva no epitélio uterino das gestações manipuladas foi menos evidente em relação às de gestações naturais, assim como aos 90 dias, que apresentou maior imunorreatividade em comparação aos 60 dias e dos animais de gestação natural sobre os manipulados. Na última idade gestacional foi possível observar reação em padrão de fileiras no epitélio uterino e para ambos os grupos não foram encontradas marcações nos tecidos fetais. Neste estudo foi demonstrado desequilíbrio nos padrões de apoptose nos conceptos bovinos clonados transgênicos, pois no início da gestação (60 dias) apresentaram menor atividade apoptótica e aos 90 dias um aumento, podendo ser este fato um dos fatores que levam às anormalidades placentárias. Desse modo os resultados da verificação da apoptose, nas fases de gestação estudadas, e seu entendimento são importantes para a compreensão de possíveis falhas no desenvolvimento gestacional em técnicas avançadas de manipulação embrionárias, como a produção de animais transgênicos e clonados.

Palavras Chave: Apoptose, Transgenia, Clonagem, GFP

**PLACENTAL GROWTH REGULATION: APOPTOTIC MECHANISM IN NORMAL AND IN CLONED CATTLE AND TRANSGENIC CONCEPTUSES GESTATIONS, THAT EXPRESSED THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)**

**ABSTRACT**

The placenta in mammals is a transitional organ formed by the juxtaposition between maternal and fetal tissues, it is responsible for physiological exchanges between mother and fetus and the synthesis of hormones essential for maintaining gestation. For the fetal placental growth and nutrition are requires a delicate balance between proliferation and death cells of the placenta. These cells have specific properties in relation to its metabolic functions, endocrine and angiogenic and it is critical to the proper development of the fetus throughout pregnancy and birth. Cloned animals often have abnormal pregnancies as hidroamnion, hidroalantois, placental edema, retained placenta and abortion. In this study, placentomes the occurrence of apoptosis (death cells) was avaluate from fetuses cloned transgenic cattle (n = 5) and natural pregnancies (n = 18) in periods of 60 and 90 days of gestation that had their intermitted development to remove the pregnant uterus. Placentome samples were segmented and fixed in aqueous 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.4 and 0.1M, to check the morphology of HE staining and the immunohistochemistry. The results were compared between transgenic cloned cattle and natural gestations. In all groups and gestational ages analyzed showed the same cellular composition with simple cubic uterine epithelium, it is noted the presence of trophoblast giant cells mononuclear and giant trophoblast cells binucleated migrated from fetal epithelium, endometrial stroma well developed, trophoblastic epithelium with typical cuboid cell epithelium and severe amount of giants and giant binucleated trophoblastic cells migrating into maternal epithelium and mesenchyme. All groups and gestational periods, maternal epithelium showed higher positive staining for apoptosis. At 60 days the positive staining in the uterine epithelium is less evident manipulated pregnancies in relation to natural pregnancies as well as at 90 days, with the highest immunoreactivity when it is compared to 60 days and in the animals of natural pregnancy in ratio to manipulated animals. In the last gestational age was observed in response pattern rows in the uterine epithelium and both groups fetal side tags were not found either in or on the epithelium and mesenchyme. This study demonstrated an imbalance in apoptosis patterns in transgenic cloned cattle fetuses as early in pregnancy (60 days) showed less apoptotic activity and an increase at 90 days and may be this fact one of the factors leading to placental abnormalities. Thereby the results of the verification of apoptosis at the stages of pregnancy studied and comprehension are important for the understanding of possible failure in gestational development in advanced embryonic manipulation techniques, such as the production of transgenic and cloned animals.

Keywords: Apoptosis, Trangenesis, Cloning, GFP

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural (A e B) e transgênicos e clonados (C e D) aos 60 dias, coloração HE. A) Observa-se a presença de células cuboides compondo o epitélio uterino e células colunares compondo o epitélio trofoblástico com CTG e CTGB em ambos os epitélios (seta branca) e CTGB (seta preta) nos tecidos fetais. B) Destaque CTG (seta branca) migrada para o epitélio materno. C) Estroma desenvolvido e CTGB no tecido fetal (seta preta). D) Destaque CTGB (seta preta) nos tecidos fetais próximo ao epitélio materno. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).....35

**Figura 2 :** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural (A e B) e transgênicos e clonados (C e D) aos 60 dias, coloração HE. A) Observa-se a presença de células cuboides compondo o epitélio uterino com CTGs (seta branca). B) Destaque CTG (seta branca) migrada para o epitélio materno. C) Estroma e mesênquima desenvolvidos, CTGs (seta branca) e CTGs nos tecidos fetais (seta preta). D) Destaque de CTGs (seta branca) e CTGBs (seta preta) nos tecidos fetais próximos ao epitélio materno. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E). .....36

**Figura 3:** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural de 60 dias, imunoistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade detectada principalmente no citoplasma das células epiteliais uterinas (seta). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio trofoblástico com CTG reativas (seta preta). D) Controle negativo de C. E) Detalhe CTG no epitélio fetal na zona de contato entre esse e o materno (seta preta) com padrão de apoptose de cariorréxe. F) Controle negativo de E. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).....38

**Figura 4:** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação de animal transgênico e clonado de 60 dias, imunoistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade no núcleo das células epiteliais maternas (seta laranja) e fetais em menor intensidade com CTG reativas (seta amarela em fase cariorrética, Corpúsculos apoptóticos (seta sem cauda). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio materno com CTG reativas (seta amarela) em fase pcnótica e corpúsculos apoptóticos (seta sem cauda). D) Controle negativo de C. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).....39

**Figura 5:** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural de 90 dias, imunoistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade detectada no citoplasma das células epiteliais apenas uterinas em padrão de fileiras (seta), célula reativa isolada no estroma endometrial (seta sem cauda). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva do envelope nuclear das células do epitélio materno com padrão enfileirado (seta simples) e CTG reativas (seta preta). D) Controle negativo de C. E) Detalhe de célula reativa isolada no estroma endometrial (seta sem cauda). F) Controle negativo de E. Epitélio materno (Em); estroma endometrial (E). .....41

**Figura 6:** Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação transgênico e clonado de 90 dias, imunoistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade detectada no núcleo e também no citoplasma das células epiteliais maternas (seta simples) em fileiras, além de CTGs (seta preta) B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio materno na zona de contato entre esse e o fetal (seta). D) Controle negativo de C. E) Marcação também em padrão de fileiras no epitélio uterino (seta simples) com CTGs em fase cariorrética (seta preta). F) Controle negativo de E. Epitélio materno (Em); estroma endometrial (E). .....42

## 1 INTRODUÇÃO

A atividade pecuária oferece a maior fonte alimentar de proteína animal disponível atualmente no Brasil, o rebanho brasileiro é composto majoritariamente por espécies zebuínas e seus mestiços e de bubalinos, que são encontrados distribuídos em diferentes escalas em todo território nacional devido a sua adaptação ao predominante clima tropical do país (IBGE, 2007).

A bovinocultura brasileira é caracterizada pela criação extensiva e baixo uso de insumos, mesmo com os a ascensão dos confinamentos no país esse ainda representa apenas 8% da finalização do rebanho nacional, entretanto, ambos os setores buscam a geração de animais com alta produtividade e reprodutividade a baixo custo e com menor impacto ambiental, o que conduz a pecuária a investir na implantação de um perfil mais tecnológico (FACCIOTI et al., 2009).

Os avanços tecnológicos na pecuária de corte se destacam, na área reprodutiva, com o desenvolvimento de técnicas que forneçam o máximo aproveitamento de caracteres genéticos de interesse econômico na recria, utilizando para tal, por exemplo, técnicas de fecundação *in vitro*, transferência de embriões e até mesmo as mais complexas de clonagem e transgenia. Contudo, tais biotécnicas estão associadas a anormalidades gestacionais que podem culminar em abortos, anomalias fetais, prolongamento da gestação, ausência ou redução de sinais de parto e menor sobrevivência de bezerros pós-parto. Estas falhas estão relacionadas principalmente 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 e ainda se faz necessário aprofundar os conhecimentos quanto a eficiência de tais técnicas a fim de viabiliza-las para utilização mais ativa na produção animal (MIGLINO, 2004).

A placenta dos ruminantes é um órgão transitório que promove a interação entre a mãe o feto, apresenta áreas especializadas de justaposição entre os tecidos maternos, representados pelas carúnculas e os cotilédones fetais chamados placentônios, e são as zonas de comunicação entre a mãe e o feto. Nesta interface ocorrem as trocas metabólicas indispensáveis para o desenvolvimento do concepto (LEISER; KAUFMAN, 1994).



Para que ocorra o desenvolvimento placentário normal, a placenta sofre várias alterações morfológicas que incluem o balanço adequado entre proliferação e a apoptose das células para manter a homeostase tecidual no órgão. A apoptose, por sua vez, é um fenômeno responsável pela eliminação de células em organismos multicelulares, como uma forma de suicídio celular. É um componente essencial para a vida, uma força igual e oposta à mitose (BOWEN, 1993; MAJNO; JORIS, 1996). Pode ser facilmente identificável à microscopia de luz devido a seus eventos morfológicamente coordenados. Alterações nos padrões de morte celular são responsáveis por diversas anomalias nos tecidos, no que se refere ao desenvolvimento embrionário e placentário, variações nas taxas de apoptose são responsáveis por retenção placentária, estresse fetal e redução imunológica materna (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al. 2004; MARTINS et al. 2004).

Com a identificação da apoptose nos placentônios bovinos espera-se compreender os mecanismos de falhas gestacionais que levam a anormalidades fetais e placentárias principalmente no que se refere à gestações associadas a técnicas de manipulação embrionária como clonagem e transgenia.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Útero, Placenta e Placentônio**

Os órgãos genitais femininos bovinos são semelhante ao das outras fêmeas de ruminantes, apresentando útero bicórneo com dimensões, quando não gestantes de 4,0 a 5,0 centímetros de corpo uterino, cada corno medindo de 15 a 25 centímetros de comprimento e aproximadamente 3 de diâmetro e pouco sinuoso, cada corno possui sua própria tuba uterina e ovário adjacente medindo, respectivamente, de 1 a 4 centímetros de comprimento e de 1 a 3 de diâmetro, números que variam de acordo com a fase do ciclo estral; há apenas um colo uterino. (EWIES; KHAN, 2015).

O epitélio uterino é do tipo pseudoestratificado cilíndrico, frequentemente intercalado por áreas de epitélio cúbico simples. Glândulas endometriais estão presentes em grande número, principalmente no estrato profundo e são constituídas por epitélio cilíndrico simples. Após a puberdade pode-se observar ainda a presença

de grupos de vasos sanguíneos com parede espessada. No perimétrio é possível perceber um espessamento, pregueamento e grande quantidade de fibras elásticas (MONTEIRO et al., 2003).

A mucosa endometrial uterina apresenta, nos ruminantes, estruturas projetadas denominadas carúnculas uterinas, tais estruturas podem ser observadas antes da gestação de maneira menos pronunciada. As carúnculas são projeções do tecido sub-epitelial uterino e apresentam, nas vacas, morfologia convexa, e côncava em ovinos (MOSSMAN, 1987). No início da gestação apresenta aspecto liso, evoluindo para forma esponjosa a partir da metade da gestação onde exibe, na superfície, criptas com aspecto de colmeia, as criptas são as áreas de contato com os vilos coriônicos do feto, sendo assim chamadas zonas de trocas materno-fetais (SHARMA et al., 1983; RAM; CHANDRA, 1984; PEREIRA et al, 2010). O endométrio entre as carúnculas é tido como intercaruncular ou intercotiledonário e não participa das funções placentárias (ROBERTS, 1986).

A placenta, por sua vez, localiza-se no útero gestante e é atribuída aos mamíferos eutérios (IGWEBUIKE, 2009). É um órgão complexo, transitório e de comunicação entre a mãe e o feto que sofre, em seu desenvolvimento, modificações quantitativas e qualitativas nas estruturas macro e microscópicas, inicia sua formação a partir da implantação do blastocisto na mucosa uterina e representa o elemento funcional da unidade biológica materno fetal. (OLIVEIRA et al; 2006; CHANG et al. 2014). A placenta é bem definida como sendo a justaposição das membranas fetais com o endométrio, que permite trocas fisiológicas (oxigênio, nutrientes e remoção de resíduos do sangue fetal) entre a mãe e o feto e está ligada ao embrião pelo funículo umbilical (GUDMUNDSSON; DUBIEL; SLADKEVICIUS, 2009).

Nos ruminantes é classificada como zonaria cotiledonária em virtude de sua estrutura macroscópica onde apresenta áreas restritas de contato materno-fetal, os cotilédones; córioalantóica devido à fusão do cório com o alantoide, os quais, junto com o âmnio constituem as membranas extra-embrionárias e sinepiteliocorial, uma vez que são encontradas células trofoblásticas gigantes binucleadas fetais migrando para o epitélio materno (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFMAN, 1994).

Ela também apresenta um importante papel na promoção do reconhecimento materno da prenhez e na sobrevivência do feto através da secreção de interferon tau (INF-  $\tau$ ), o qual inibe a regressão do corpo lúteo através da

supressão da liberação endometrial de prostaglandina F<sub>2α</sub>. O INF- $\tau$  também evita a expressão dos receptores de ocitocina endometriais e afeta a síntese de citocinas do sistema imune materno, evitando a rejeição do concepto. (IGWEBUIKE, 2006).

Nos ruminantes a placenta apresenta duas regiões definidas: os placentônios e a região lisa entre esses denominada região interplacentomal. Os placentônios juntamente as glândulas endometriais são responsáveis pela transferência histiotrófica de nutrientes, essa corresponde à primeira fonte nutricional disponível para o desenvolvimento do concepto, a literatura sugere que seu papel é essencial na sobrevivência e crescimento do feto durante a gestação (SPENCER et al., 2004). O embrião é completamente subordinado a esta nutrição no início da gestação, uma vez que, depende dela por um período prolongado de seu desenvolvimento (THOMPSON, 2006).

Alguns tecidos separam a circulação materna da fetal na placenta, do lado materno são observados os vasos sanguíneos e o tecido conjuntivo, aqui denominado estroma endometrial e do lado fetal o epitélio coriônico ou trofoblástico, tecido conjuntivo, denominado mesênquima e também vasos (LEISER; KAUFMAN, 1994).

A placenta é adequadamente descrita na literatura como sendo repleta de vilosidades que agrupadas formam os cotilédones e estes são entremeados por regiões de cório liso, os cotilédones se alojam em criptas de tamanho correspondente na carúncula materna. A superfície externa da placenta é recoberta pelos cotilédones, os quais se unem as carúnculas do útero para a formação dos placentônios (JENKINSON, 1925)

O placentônio é a unidade morfofuncional da placenta dos ruminantes, composto pela junção da carúncula e dos cotilédones. Essa é a região específica onde ocorrem as trocas fisiológicas entre o organismo materno e o feto, posto que é ricamente vascularizada por capilares de ambos os organismos. Relatos na literatura elucidaram o importante papel do placentônio na manutenção e sucesso da gestação além da nutrição do feto (STEVEN, 1975; LEISER, KAUFMAN, 1994; CARVALHO et al., 2006). É definida como o local predominante de trocas de nutrientes e gases entre a mãe e o feto e apresenta regiões específicas de transferência de ferro da mãe para o feto (MIGLINO; DIDIO, 1992; PEREIRA et al., 2010).

A formação do placentônio tem início com crescimento do trofoblasto e a formação de vilosidades coriônicas que posteriormente são preenchidas por mesênquima vascularizado. As vilosidades coriônicas preenchem as criptas presentes nas carúnculas uterinas e assim o trofoblasto adquire um arranjo ramificado semelhante a uma árvore que se aprimora e desenvolve com o decorrer da gestação. Os tecidos endometriais então se hipertrofiam ao redor da vilosidade resultando no placentônio. A interdigitação formada entre os tecidos fetais e maternos produz uma firme aderência, aumentando a zona de contato e troca entre eles (BJÖRKMAN, 1969). Os capilares maternos tem origem na periferia do placentônio e seguem em direção à depressão central, os vasos fetais, por sua vez, seguem a direção oposta, formando um sistema contra corrente que aumenta a eficiência das trocas entre estes (STEVEN, 1975).

Nos bovinos os placentônios estão dispostos acompanhando o arranjo das carúnculas uterinas: quatro fileiras no corpo do útero, três no centro e dois na extremidade dos cornos uterinos. Esses podem ter formado circular, elíptico ou quadrangular, e em alguns casos pode ocorrer fusão de placentônios vizinhos (MIGLINO, 1991). Além da morfologia, o número de placentônios também é variável, contudo, sempre o corno gestante apresenta número superior ao não gestante. A literatura relata que o número médio em *Bos taurus* é de 88, com mínimo de 54 e máximo de 147 placentônios (BJÖRKMAN, 1954; MIGLINO, 1991).

Quanto ao tamanho, pode-se relacionar a dimensão do placentônio com a idade gestacional, relevando que esta estrutura se desenvolve e aprimora para suprir as necessidades do feto nos diferentes períodos da prenhez, observaram também que o crescimento mais significativo ocorre durante a primeira metade da gestação (ADEYINKA et al., 2014)

Microscopicamente observa-se na placenta bovina, que o epitélio trofoblástico é constituído por células trofoblásticas mononucleadas e células gigantes que por sua vez podem ser binucleadas ou possuírem um único núcleo gigante, ambas podem ser encontradas nos placentônios e nas regiões entre esses. As células trofoblásticas mononucleadas (CT) dos bovinos são cuboides típicas de tecidos epiteliais, localizam-se na lâmina basal e representam aproximadamente 80% da constituição trofoblástica. No ápice dessas células a membrana celular é formada por microvilosidades que se interdigitam com processos similares presentes

nas células epiteliais, formando a zona de contato e troca materno–fetal (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977; WOODING, 1984; WOODING et al., 1996).

As células mononucleares estão envolvidas na fagocitose, especialmente de hemácias nas áreas hemófagas no placentônio (nutrição hemotrófica). Esse mecanismo de fagocitose de hemácias maternas extravasadas é denominado eritrofagocitose e ocorre na zona arcada do placentônio, região correspondente a base dos vilos coriônicos e topo das criptas uterinas (PEREIRA et al., 2001). A literatura sugere que as áreas hemófagas ou hematomas placentários têm o papel de transferir ferro do sangue materno para o feto (WINSATT, 1980; MOSSMAN, 1987; SANTOS et al., 2006; PEREIRA, 2010).

As células trofoblásticas gigantes são em sua maioria binucleadas e não apresentam características típicas de tecido epitelial, compõem aproximadamente entre 15 a 20% da constituição celular trofoblástica (WOODING, 1982). A literatura revela que tais células são originadas a partir das células trofoblásticas mononucleares através de um processo de mitose acitocinética, onde ocorram sucessivas mitoses com duplicação cromossômica e cariocinese, porém, sem citocinese (KLISCH et al., 1999).

Como descrito, rotineiramente é possível observar a migração de células gigantes binucleadas do epitélio trofoblástico para o materno, onde se fundem. A migração ocorre pela formação de pseudópodes e temporariamente células híbridas trinucleadas são formadas, constituindo uma estrutura denominada sincício. Após a formação do sincício as células híbridas se degeneram e o conteúdo citoplasmático é reabsorvido no compartimento materno. Este processo é necessário para que ocorra o transporte e liberação dos grânulos presentes na célula trofoblástica na figura materna, estes grânulos são compostos por hormônios como: lactogênio placentário, estradiol e progesterona, além de fatores de crescimento associados ao desenvolvimento fetal e manutenção da gestação (WANGO; WOODING; HEAP, 1990; SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000; LANG et al., 2004).

Com a aproximação do término da prenhez inicia-se a maturação placentária, processo mediado pela apoptose e definido por mudanças histológicas concentradas no epitélio das criptas maternas onde nota-se que o número e peso destas células diminuem, além de se tornarem achatadas e largas o que estabelece maior contato entre células trofoblásticas e de revestimento do tecido conjuntivo materno, em algumas áreas pode até mesmo faltar o epitélio materno. Ou seja, a maturação do

órgão promove maior contato entre as circulações sanguíneas materna e fetal e é um pré-requisito para o desprendimento e a liberação das membranas fetais ao parto (STALLMACH et al., 2001). As células gigantes também diminuem em número a partir do segundo trimestre de gestação e significativamente mais próximo ao parto (GROSS; WILLIAMS; RUSSEKCOHEN, 1991).

Tendo em vista as características abordadas a respeito da placenta, a íntima relação entre os tecidos maternos e fetais são essenciais para a manutenção e sucesso da gestação. No decorrer desse processo se fazem necessários diferentes mecanismos para manutenção da homeostase tecidual, dentre eles, a apoptose, responsável pela eliminação das células desnecessárias ou comprometidas, pela maturação placentária e liberação das membranas fetais ao parto. Alterações nesses mecanismos são responsáveis pela baixa taxa de implantação fetal e um alto número de perdas embrionárias em animais manipulados em laboratório, o que comprova a necessidade da avaliação das alterações morfológicas em animais clonados e transgênicos, uma vez que estes representam um importante modelo experimental para pesquisas na área de reprodução e melhoramento.

## **2.2 Modelos Experimentais: Clonagem e Transgenia**

A clonagem animal a partir de uma célula diferenciada foi uma técnica originalmente desenvolvida para testar a hipótese sobre a diferenciação celular e a gradual perda da sua informação hereditária (CAMPBELL et al., 2005). Atualmente a técnica possui objetivos voltados a produção de animais de alto valor genético, preservação de espécies em extinção e criação de bancos genéticos, além de servir de modelo experimental para estudos de diversas áreas. Na experimentação científica a técnica mostra-se eficaz, além de servir de base para a produção de animais transgênicos (RUMPF, 2007).

A técnica de clonagem mais difundida atualmente é a por transferência nuclear de célula somática (TNCS). O processo pode ser dividido em duas etapas, onde a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda em reconstruir o embrião a partir da célula enucleada e do núcleo de uma célula somática diferenciada e transferi-lo para uma receptora. Os oócitos receptores são comumente obtidos de ovários de animais

abatidos e maturados *in vitro*, ou colhidos de animais vivos, já as células doadoras de núcleos podem ter origem de células embrionárias, fetais ou de animais adultos. Após a reconstrução, os embriões são cultivados até o estágio de mórula ou blastocisto e transferidos para receptoras, onde posteriormente poderão ser destinados para linhagens celulares ou congelados (GONSALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2001).

Mesmo com a vasta gama de benefícios proporcionados pela técnica de clonagem em animais na pesquisa científica, o procedimento ainda é intensivamente discutido no sentido de sua viabilidade em grande escala. Apenas de 6 a 8% dos fetos apresentam-se viáveis ao nascimento (MIGLINO, 2004). Ora devido a baixas taxas gestacionais ora pelas altas taxas de perdas embrionárias e até mesmo após o nascimento devido a anormalidades fetais e placentárias (HEYMAN et al., 2002; CHAVATTE-PALMER et al., 2004).

Associa-se às falhas no processo de reprogramação nuclear do embrião clonado a causa das baixas taxas na produção de embriões e gestação, incluindo altas taxas de aborto, mortalidade perinatal e anormalidades do feto e da placenta, Os genes "*imprinted*", caracterizados por apresentarem um padrão de expressão gênico diferenciado de seus alelos parentais não são corretamente reprogramados nos clones, e estes mesmos genes exercem função essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento do feto, bem como da placenta (REIK et al., 2001; GONSALVES, FIGUEIREDO E FREITAS, 2001).

Alterações nos envoltórios fetais como descolamento prematuro da placenta, mola hidatiforme, hidroâmnio, hidroalantoide, edema placentário e de funículo umbilical, placentônios aumentados e em menor número foram frequentemente observados nas gestações de clones. Nos bezerros nota-se: imaturidade pulmonar (HILL et al., 1999), aspiração de mecônio (HEYMAN et al., 2002), defeitos cardíacos congênitos (KRUIP, DEN DAAS, 1997), estreitamento da traqueia (CONSTANT et al., 2006; MAIORKA et al. 2015), aplasia de timo (PACE et al., 2002), síndrome do bezerro grande (SOUSA et al., 2001), alterações cromossômicas e vasculares (MIGLINO et al., 2007b; FARIN et al., 2006). A maioria das perdas gestacionais dos conceptos clonados ocorrem no período crítico que vai de 30 e 60 dias de gestação, idade na qual ocorre a transição da nutrição fetal vitelínica para a placentária (WELLS, 2005; ASSIS NETO et al., 2009).

As alterações na morfofisiologia placentária estão entre as principais causas de perdas gestacionais de clones bovinos e estão relacionadas à deficiência do desenvolvimento vascular placentário, demora na implantação, placentomegalia e conseqüentemente deficiência na funcionalidade deste órgão (BORDIGNON; SMITH, 2008). Falhas no desenvolvimento da placenta correspondem a aproximadamente 82% das mortes em bovinos clonados entre o 30º e 90º dia de gestação e que poucos neonatos apresentam fenótipo, crescimento e sistema imune funcional (MIGLINO, 2004). Perdas no primeiro trimestre gestacional estão, geralmente, atribuídas à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantoide em decorrência da falta ou ineficiência de vascularização, à rejeição imune e a alterações nos placentônios (HILL et al., 2000), além do desenvolvimento deficiente da placenta definido pela presença de poucos placentônios, com número reduzido a aproximadamente 60% do total e cerca de 50% maior em tamanho e baixa vascularização. Os locais de trocas materno-fetais podem ainda apresentar-se intumescentes com focos hemorrágicos, fato que se relaciona diretamente ao comprometimento vascular (MIGLINO, 2004).

A clonagem, como modelo experimental, também é fundamental no tocante que possibilita a transgenia. Animal transgênico é aquele que possui em seu genoma um material genético de outra espécie e assim expressa em seu fenótipo proteínas do genótipo da espécie implantada (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009). A inclusão desse genoma exótico tem diversas finalidades experimentais e terapêuticas como por exemplo inibir a expressão do patógeno causador da diarreia bovina pela inserção do plasmídeo “*tecdual short hairpin RNA (shRNA)*” no epitélio renal de ovinos, onde pode-se concluir que a técnica de transgenia pode auxiliar na obtenção de animais resistente à patologia (NI et al., 2015), ou também avaliar a expressão de proteínas do leite humano pela inserção de um plasmídeo para tal nas glândulas mamárias de bovinos na qual pode se observar que tal inserção não altera a produtividade normal das glândulas mamárias. Calcula-se que esta biotécnica tem potencial que permitiria que de 10 a 100 vacas produzissem proteínas farmacêuticas suficientes para atender a demanda mundial, com um custo de produção mais satisfatório que a indústria tradicional (MORRIS; DISKIN; SREENAM, 2001).

Na reprodução bovina a clonagem e a transgenia para inserção de um marcador fluorescente como o GFP (*green fluorescent protein*) no feto pode revelar a localização de receptores de fatores de crescimento celular no útero e na placenta



desses animais em diferentes estágios da gestação além de mostrar a correlação entre tais fatores cuja função é essencial para a implantação do blastocisto no útero e manutenção da prenhez (BORDIGNON et al. 2003). Como pode também nos mostrar a capacidade de migração de células trofoblásticas de fetos bovinos pela sua marcação através do gene exótico no tecido materno (PEREIRA et al. 2013).

Analisando todas as informações acima, sugere-se que a transição entre o primeiro e o segundo trimestre de gestação é crucial no sucesso da gestação devido às notáveis e importantes mudanças que ocorrem no período e que elucidar os mecanismos das falhas das gestações manipuladas para esses períodos é fundamental para viabilizar as biotécnicas de reprodução.

### **2.3 Apoptose**

Células mortas ou em processo de morte são comuns nos tecidos, quando encontradas isoladas comumente indicam renovação celular e até mesmo condições patológicas. Durante o desenvolvimento da gestação, diversos tecidos apresentam um ritmo acelerado de proliferação celular, para manter a homeostase desses tecidos se faz necessário um mecanismo para eliminação de células cuja função não é mais necessária, e assim como no feto, os tecidos uterinos e placentários apresentam tais fenômenos de morte celular programada geneticamente ou não, conhecido como apoptose. Apoptose trata-se de um dos eventos fisiológicos responsáveis pela morte de células em organismos multicelulares, esse fenômeno mantém a homeostase tissular eliminando células específicas sem dano as outras células a seu redor. É um processo ativo dependente de gasto energético e síntese proteica e ocorre em resposta a diferentes mecanismos disparadores (KERR; SEARLE, 1972). Possui fundamental importância para muitos processos biológicos incluindo o desenvolvimento embrionário, crescimento, atrofia, injúria tóxica, infecções virais, patogênese de doenças neurodegenerativas, respostas imunológicas e de tumores a quimioterapia. Distingue-se da necrose pelas características fisiológicas de origem endógena, uma vez que a necrose é sempre patológica com a presença de processo inflamatório e caracterizado pela incapacidade celular em produzir ATP para manter a homeostase tecidual (BENETONE, 2005; LU et al., 2014). A apoptose é, portanto, uma forma de suicídio celular e é entendida

como um componente essencial para a vida, uma força igual e oposta à mitose (BOWEN, 1993; MAJNO; JORIS, 1996).

O termo apoptose, assim como sua classificação bioquímica e morfológica foi inicialmente cunhado em 1972 (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Contudo, as primeiras observações de apoptose, ainda não com esta terminologia, foram feitas em 1885 em estudos com folículos ovarianos em regressão (FLEMMING, 1885).

Possui características morfológicamente coordenadas e marcantes visíveis ao microscópio de luz como se segue: aparente diminuição do tamanho da célula e perda de justaposição com o meio extracelular pela perda dos dispositivos de aderência e eosinofilia do citoplasma. Organelas e membrana nuclear ainda se mantêm inalteradas, a cromatina se condensa (picnose) e em seguida ocorre a formação de prolongamentos denominados *blebs* na membrana plasmática, seguido pela desintegração do material genético (cariorréxe), que, nesse estágio, se apresenta envolto por membrana nuclear. O mesmo ocorre com o conteúdo citoplasmático, que se desintegra (cariólise) e os fragmentos envoltos por membrana celular formam os “corpos apoptóticos” ou “corpúsculos apoptóticos”. Esses são rapidamente fagocitados por macrófagos, células vizinhas e trofoblasto evitando o processo inflamatório (YOUNG; HEATH, 2001; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Além de ser disparada através dos receptores de morte exógenos à célula, também pode ser iniciada por injúrias endógenas capazes de danificar o DNA (BENETONE, 2005; ALBERGHINA; COLANGELO, 2006). Todos os eventos são dinâmicos e ocorrem dentro de poucas horas. No entanto, já foi evidenciado que essas duas vias estão ligadas e que as moléculas de uma via podem influenciar na outra e que ambas as rotas convergem para uma mesma etapa de execução, que vai resultar, no final, na fagocitose celular (ALBERGHINA; COLANGELO, 2006).

A denominação “morte celular programada” nos remete ao conceito que muitos tipos celulares são programados para a morte, entretanto, este termo refere-se ao mecanismo enquanto o termo apoptose está ligado ao padrão morfológico da morte celular. Em sua definição original, apoptose é corretamente definida de acordo com as mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem nas células que estão morrendo. A literatura sugere que os termos não sejam usados como sinônimos e que se refiram apenas aos produtos finais das vias de morte celular, posto que estas podem ser programadas ou não programadas (EASTMAN, 1993).

Dois mecanismos disparadores estão conhecidamente envolvidos no processo apoptótico. O primeiro é mediado por um fator receptor ligante na superfície celular externa, onde as moléculas ativadoras TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  sigla em inglês para fator de necrose tumoral alfa e beta, ligam-se ao receptor celular TNF, os ativadores FasL (Ligante Faz) aos receptores Faz ou CD95 (Ligante de receptor de morte 95) que são produzidas pelo sistema imune (LEHNINGER, 2002; ELMORE, 2007; OKOUCHI, EKSHHYAN; MARACINA, 2007). Os receptores transmitem o sinal de morte através da membrana celular a proteínas citosólicas como o TRADD e FADD (domínio de morte associada ao Faz) para os receptores TNF e Faz, respectivamente (JANEWAY, 2000). Tais proteínas ativam as pró-caspases, que são a forma inativa da proteína apoptótica caspase 8, essa, quando em sua forma ativa inicia a cascata de proteases e ao final da via a CAD (DNase ativada por caspase) entra no núcleo e cliva o DNA, produzindo fragmentos característicos das células apoptóticas (JANEWAY, 2000; DE ROBERTIS; HIB, 2001). O processo de apoptose também pode ser desencadeado automaticamente, no caso de tipos celulares com vida curta (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

O segundo mecanismo nos mostra que sinalização interna envolve uma variedade de estímulos não mediados por receptores e que produzem sinais intracelulares que agem sobre alvos dentro da célula e convergem na mitocôndria. Os estímulos que dão início a via intrínseca produzem sinais intracelulares que podem agir de modo positivo ou negativo. Sinais negativos envolvem a ausência de determinados fatores de crescimento, hormônios e citocinas que podem levar à perda da supressão da apoptose, ativando a mesma (ELMORE, 2007). Outros estímulos, que agem de forma positiva, incluem a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais, danos no DNA e os radicais livres (JIN; EL-DEIRY, 2005). Nesse caso, sinais de morte são detectados pela mitocôndria que em caso de morte é permeada pelas proteínas BAX que liberam citocromo c da cadeia transportadora de elétrons no citosol. No citoplasma, o citocromo c liga-se ao fator Apaf-1, até então inibido pela ligação com proteínas BCL-2 na superfície externa da mitocôndria, e na presença de ATP ativam a caspase 9 na extremidade do citocromo, esse por sua vez ativa a caspase 3 que inicia a cascata de proteases, culminando na apoptose (LEHNINGER, 2002; AMARANTES; MENDES, 2003).

Como vimos, duas grandes famílias de proteínas são responsáveis por regular e executar a cascata de eventos que resulta na apoptose, são elas a Bcl-2 e

caspases. A família da cisteína protease das caspases promove a clivagem de grande número de proteínas que conduzem a apoptose, incluindo a formação de núcleos fragmentados e corpos apoptóticos (EARNSHAW et al., 1999; SPANOS et al, 2002).

Atualmente já foram descritas 12 tipos de caspases em mamíferos classificadas em dois principais grupos: caspases iniciadoras (- 1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) e caspases efetoras ou executoras (-3, -6 e -7) (MEÇA et al., 2011). Tais proteínas são sintetizadas em sua forma inativa e apenas tornam-se ativas após o recebimento do sinal de morte pela célula. A princípio tornam-se ativas as caspases iniciadoras, e em seguida as caspases executores, essas são responsáveis por clivar as proteínas essenciais a integridade da célula, juntamente às endonucleases que clivam o DNA (NAGATA, 2000; AMARANTES-MENDES, 2003).

A família Bcl-2 modula a atividade das caspases e foi a primeira proteína relacionada à caspase a ser identificada. A família é subdividida em pró-apoptótica (BAX, BAD, BID, Bcl-xS, BAK, BOX, BIK, BLK, BIM, HRK, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria, e anti-apoptóticas ou inibidoras (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático, acredita-se que a proporção entre proteínas pré e anti-apoptóticas determina se uma célula inicia ou não os eventos que culminam na apoptose (SPANOS et al., 2002; MEÇA et al., 2011; WANG et al, 2013).

A ação das proteínas da família Bcl-2 provocam mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial e tais alterações podem causar morte celular, contudo, sem a sinalização de morte são prevenidas pelos fatores anti-apoptóticos Bcl-2, localizados na membrana externa das mitocôndrias. Durante a apoptose proteínas pró-apoptóticas (BAX e BAD) são ativados e translocadas do citoplasma para o interior das mitocôndrias. Esse desequilíbrio das proteínas da família Bcl-2, conforme vimos, rompe a membrana mitocondrial resultando em um derrame de citocromo c (até então restrita a membrana mitocondrial interna) no citosol. O citocromo c caspase é então ativado no citosol, onde fragmenta o DNA nuclear e provoca a morte celular (WOLTER et al., 1997; SPANOS et al, 2002; WANG et al, 2013).

As caspases são, portanto, responsáveis pelos eventos bioquímicos que promovem as modificações morfológicas que culminam na morte da célula, mas

alguns fatores são importantes de se ressaltar: (I) a proteólise é irreversível, sendo a regulação das proteases limitada ao controle de sua atividade e da disponibilidade de substratos, posto que não há como voltar atrás após a clivagem de uma proteína; (II) as proteases são sintetizadas inativas e ativadas por catalise no momento de sua requisição, e (III) são capazes de regular sua própria ativação através de *feedback* negativo e positivo. Elas agem modificando as proteínas que mantem as células vivas, como: membranas biológicas, proteínas responsáveis pela organização da cromatina, proteínas ligadas ao reparo e replicação do DNA e proteínas do citoesqueleto (BENETONE, 2005).

O citoesqueleto é uma rede de sustentação formada por três tipos de elementos estruturais: microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, além de proteínas acessórias que ligam essas estruturas entre si, à membrana plasmática e à membrana das organelas celulares. Os filamentos intermediários de citoqueratina são característicos das células epiteliais e formam uma rede de sustentação estática no citoplasma ancorando a membrana celular em junções intercelulares, outros exemplos de filamentos são a vimentina, a desmina, proteínas dos neurofilamentos e a proteína ácida fibrilar glial (YOUNG; HEATH, 2001).

A apoptose em células epiteliais causa problemas significativos na disposição dos componentes dos filamentos intermediários do citoesqueleto. (CAULÍN; SALVESEN; OSHIMA, 1997). O processo se caracteriza por modificações estruturais que incluem a ruptura do esqueleto de actina, além da formação de bolhas na membrana, diminuição na adesão e contato intercelular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e “empacotamento” dos fragmentos em corpúsculos apoptóticos envolvidos por membrana nuclear (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980). As chamadas citoqueratinas 8 e 18 são os principais componentes dos filamentos intermediários das células epiteliais simples. Na apoptose os filamentos intermediários da citoqueratina 18 reorganizam-se em estruturas granulares devido a fosforilação, a citoqueratina 18 libera então um fragmento proteolítico que migra com a citoqueratina 18 clivada até caspases executoras, a caspase 3 cliva a subunidade inibitória do DFF (DNA fragmentation factor), liberando a subunidade ativa desta molécula (CAD; caspase-activated DNase) cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA gerando os fragmentos oligonucleossomais característicos da apoptose. (AMARANTES-MENDES, 2003).

A citoqueratina 18, a qual possui larga distribuição no trofoblasto da placenta (AUSTGULEN et al., 2002), quando clivada dá origem a dois resíduos conservados de aspartato (CAULÍN; SALVESEN; OSHIMA, 1997) e há anticorpos que podem reconhecer tais fragmentos produzidos pelas caspases, marcando seletivamente células pré-apoptóticas e apoptóticas (BANTEL et al., 2001).

Assim, anticorpos foram desenvolvidos para interagir com a citoqueratina 18 sendo um deles o M30 CytoDeath, o qual reconhece células epiteliais apoptóticas. Esta observação levou à identificação do sítio de clivagem da caspase na citoqueratina 18 e à caracterização de um epítipo que é exposto durante a apoptose. O anticorpo M30 é específico para este sítio no reconhecimento de células apoptóticas com filamentos citoplasmáticos e agregados de queratina. Células viáveis e necróticas não são reativas (LEERS et al., 1999).

A elucidação dos mecanismos que levam a morte celular é importante no tocante de que a partir desses conhecimentos é possível compreender o desenvolvimento de uma gama de tecidos e aprimorar a metodologia para contornar falhas nos mecanismos que prejudicam seu crescimento e funcionalidade, bem como no tratamento de patologias.

O mecanismo da apoptose na placenta faz com que as células não mais funcionais possam ser eliminadas sem que ocorra a reação inflamatória no compartimento materno.

O aumento na incidência de morte celular é um importante indicador de inadequação no ambiente para embriões *in vivo* e *in vitro*. Por esta razão, faz-se necessário a detecção da apoptose durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, o estudo desse fenômeno dá novas informações sobre os processos fisiológicos durante o crescimento do embrião que podem auxiliar na obtenção de taxas mais elevadas na qualidade e de sobrevivência na produção de embriões (BETTS; KING, 2001).

Blastômeros de mamíferos na pré-implantação são capazes de submeter-se a morte celular, contudo, não antes da ativação do genoma do embrião. Acredita-se que a incidência de apoptose espontânea é provavelmente característica da espécie animal e pode ser influenciada por fatores internos e externos (FABIAN; KOPPEL; MADDOX- HYTTEL, 2005).

Quando selecionados em laboratório, o efeito da expressão apenas dos genes maternos na apoptose em células da placenta como resposta a deficiência

nutricional materna durante a gestação, enquanto na mesma situação quando na presença apenas do genoma paterno era estimulada a autofagia, ambas respostas fisiológicas tinham como objetivo manter o embrião devidamente nutrido independente da condição nutricional da mãe (PTAK et al., 2014).

Na placenta a apoptose ocorre em toda a gestação e faz parte do processo natural de maturação do órgão, mas apresenta maior frequência nos dois terços finais, uma vez que é altamente requerida para a maturação e senescência integral deste órgão após o parto. Diversos estudos relacionam a diminuição nas concentrações de BAX e caspases nos tecidos da placenta e útero com sua retenção em bovinos nelore (FACCIOTTI et al. 2009). Tais reduções nas taxas de apoptose podem influenciar não só a maturação, bem como também comprometer a funcionalidade da placenta levando a estresse fetal e ao aborto, seu papel no desenvolvimento placentário também está relacionado à tolerância imunológica materna a micro-organismos patogênicos (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al. 2004; MARTINS et al. 2004).

A apoptose é essencial para manter a homeostase celular nos tecidos placentários, como também na mucosa endometrial durante o ciclo estral, na remodelação dos tecidos uterinos na implantação do blastocisto e no desenvolvimento placentário.

### **3 OBJETIVOS**

Identificar e comparar a marcação de células apoptóticas em placentônios de gestações naturais em relação à de placentônios de conceptos bovinos transgênicos e clonados em animais de 60 e 90 dias de prenhez a partir da técnica de imunohistoquímica



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Embriões Recombinantes que Expressam a Proteína Fluorescente Verde e Embriões Controle

O material utilizado foi proveniente da Universidade de São Paulo - USP, campus de Pirassununga, SP e pertencem ao Projeto Jovem Pesquisador FAPESP, processo número 2005/52676-1, sob responsabilidade da Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira, do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião - L@mpe, sob o protocolo CEUA 002/2006, FCAT - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Campus de Dracena, Dracena/SP onde também foi realizado o presente experimento.

Para a obtenção dos animais que expressam a proteína fluorescente verde (GFP) foram utilizados fibroblastos fetais bovinos machos da raça nelore, com 30 dias de gestação e portadores do marcador mitocondrial de origem *indicus*. A inserção do gene codificador para GFP nos fibroblastos se deu por infecção viral. As células em cultivos foram inoculadas com um lentivírus (FUGW) que contém, além da região codificadora da GFP um promotor para ubiquitina. Ressaltando que tais vírus não apresentavam regiões de codificação de replicação, conferindo segurança a sua manipulação.

A identificação da Proteína Verde Fluorescente (GFP) em placentônios de gestações transgênicas e clonadas com 60 e 90 dias foi realizada utilizando os anticorpos anti-GFP (Living Colors GFP Monoclonal Antibody – Clontech, cat.#632375).

Foram utilizados 5 embriões recombinantes por transferência nuclear e os oócitos bovinos foram coletados e maturados até idade suficiente para sua enucleação (PEREIRA et al., 2013).

Após a Transferência dos Embriões (TE) de bovinos transgênicos e clonados, as 05 gestações produzidas foram acompanhadas por ultrassom e interrompidas aos 60 (n= 3) e 90 dias (n= 2) de gestação por ovariossalpingoisterectomia. Após este procedimento os úteros gestantes foram transportados em gelo para o laboratório onde foi realizada uma incisão na linha anti-mesometrial do perimétrio e miométrio no terço médio do corno uterino

gestante, expondo o endométrio, membranas fetais, placentônios e o concepto. Os placentônios foram segmentados e fixados em solução aquosa de paraformoldeído (Synth®) a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M pH 7.4.

Para as gestações naturais foram utilizadas amostras de placentônios de úteros gestantes bovinos em abatedouros frigoríficos da região de Dracena e Pirassununga - SP, para controle, 60 (n= 14) e 90 dias (n= 4) de gestação. As idades gestacionais foram determinadas segundo protocolo para mensuração da distância entre o ponto maior da cabeça e a última vertebra sacral na extremidade oposta como proposto na literatura (EVANS; SACK, 1973) e foram submetidas ao mesmo procedimento de coleta dos placentônios que os conceptos bovinos transgênicos clonados. Todas as amostras foram incluídas em Histosec (Merck®).

As amostras foram coletadas nesses períodos por serem críticos para o desenvolvimento placentário e fetal em bovinos, tanto em gestações naturais, como em manipuladas em laboratório.

#### **4.2 Técnica de Imunoistoquímica para Verificação da Apoptose – M30 CytoDEATH**

Para a realização desse trabalho foi utilizada a técnica de imunoistoquímica para a identificação da apoptose, com o anticorpo Mouse Monoclonal antibody (Clone M30 CytoDEATH - Roche®) (PEREIRA et al., 2013).

As amostras de placentônios de 60 e 90 dias de gestação incluídas em Histosec foram seccionadas em 4 µm, colocadas sobre lâminas silanizadas e incubadas em estufa a 60°C por aproximadamente 2 horas. Após esse período, as amostras foram desparafinizadas em xilóis e concentrações decrescentes de etanóis (de 100 a 70%) e lavadas em água destilada. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (20 ml de peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - em 80ml de álcool metílico) por imersão dessas lâminas durante 30 minutos sem exposição a luz, e então lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada vez. Com o bloqueio, as lâminas foram submetidas ao processo de desmascaramento antigênico em tampão citrato (160ml de citrato de sódio a 0,1M e 40ml de ácido cítrico a 0,1M completando para 2000ml de água destilada em pH 6,0) por 15 minutos em micro-ondas em potência máxima e deixadas a temperatura ambiente para esfriar. As lâminas foram então imersas em solução de 200ml de água deionizada e 1mg de leite desnatado

por 30 minutos em mesa agitadora para bloqueio dos sítios inespecíficos de reação e posteriormente secas, sobre o tecido colocou-se 50µl do anticorpo primário na concentração de 1:250 de M30 CytoDeath (utilizado para a marcação da apoptose) diluído em uma solução contendo 125µl de BSA (albumina bovina fração V) com 250µl de azida sódica em 6ml de PBS, incubadas em câmara úmida “*overnight*” a temperatura de 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS, secas e novamente incubadas com anticorpo secundário KIT LSAB Dako® por 60 minutos em câmara úmida e escura à temperatura de 4°C. Foram então banhadas em PBS (3 vezes) e novamente incubadas com 50µl /corte, com Estreptavidina – Biotina - Peroxidase por 30 minutos à temperatura de 4°C em câmara úmida e escura. A reação foi revelada com kit DAB (Diaminobenzidina - DAB-buffer substrate; DAB-chromogen, Dako® K3468): 1 ml de DAB para 0,75 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. Para finalizar, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e as lâminas permanentes foram montadas com Entelan (Merck®), para análise sob microscopia de luz, que possibilitou a visualização da marcação positiva de coloração amendoada dos núcleos e parte do citoplasma das células em apoptose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

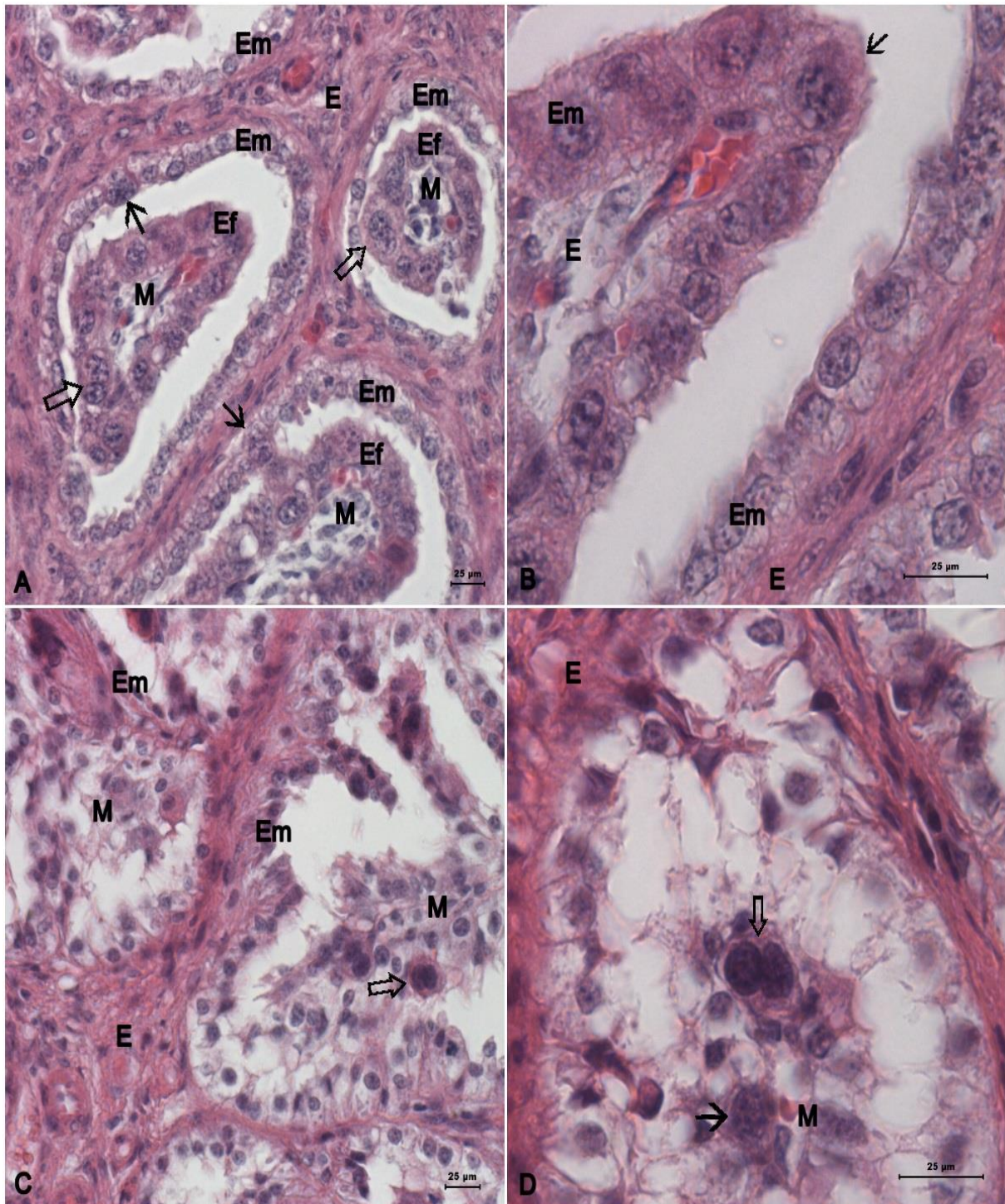
Os resultados apresentados a seguir referem-se à observação das características histológicas e da comparação da marcação da apoptose em placentônios de bovinos oriundos de gestações naturais e de animais transgênicos e clonados, no período gestacional de 60 e 90 dias.

Analisando as características histológicas das estruturas envolvidas na região de comunicação entre a mãe e o feto, verificou-se que tanto os animais clonados e transgênicos para expressão da GFP (Figuras 1 C e D com 60 dias; 2 C e D com 90 dias) como os de gestações naturais (Figuras 1 A e B com 60 dias; 2 A e B com 90 dias) possuem a mesma composição celular, com epitélio uterino simples cúbico onde podemos observar a presença de células trofoblásticas gigantes mononucleadas e células trofoblásticas gigantes binucleadas (Figuras 1 A), em pouca quantidade oriundas do epitélio fetal e estroma endometrial desenvolvido, o epitélio trofoblástico, por sua vez, apresenta-se composto por células cuboides típicas (células trofoblásticas) além de quantidade acentuada de células trofoblásticas gigantes e gigantes binucleadas migrando para o epitélio materno, tais elementos somados ao mesênquima e aos vasos sanguíneos constituem a junção materno-fetal (CAZERTA et al., 2007; PINTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

As células trofoblásticas gigantes mononucleadas (CTGs) e binucleadas (CTGBs) foram encontradas nas amostras deste trabalho e estavam presentes nos tecidos maternos e fetais (Figuras 1- 6). Resultados como este e ainda a presença de CTGB migrando do epitélio fetal para o materno, foram relatados por diversos autores (WINSATT, 1980; WOODING, 1982; MIGLINO; KLISCH; LEISER, 2000; MIGLINO et al., 2007a; 2007b; PEREIRA et al., 2001; 2013). Células trofoblásticas gigantes são intensamente requeridas no primeiro trimestre da gestação uma vez que, entre outros hormônios, secretam lactogênio placentário e progesterona, um importante mantenedor do anestro necessário à manutenção da gestação (PINTO et al., 2008).

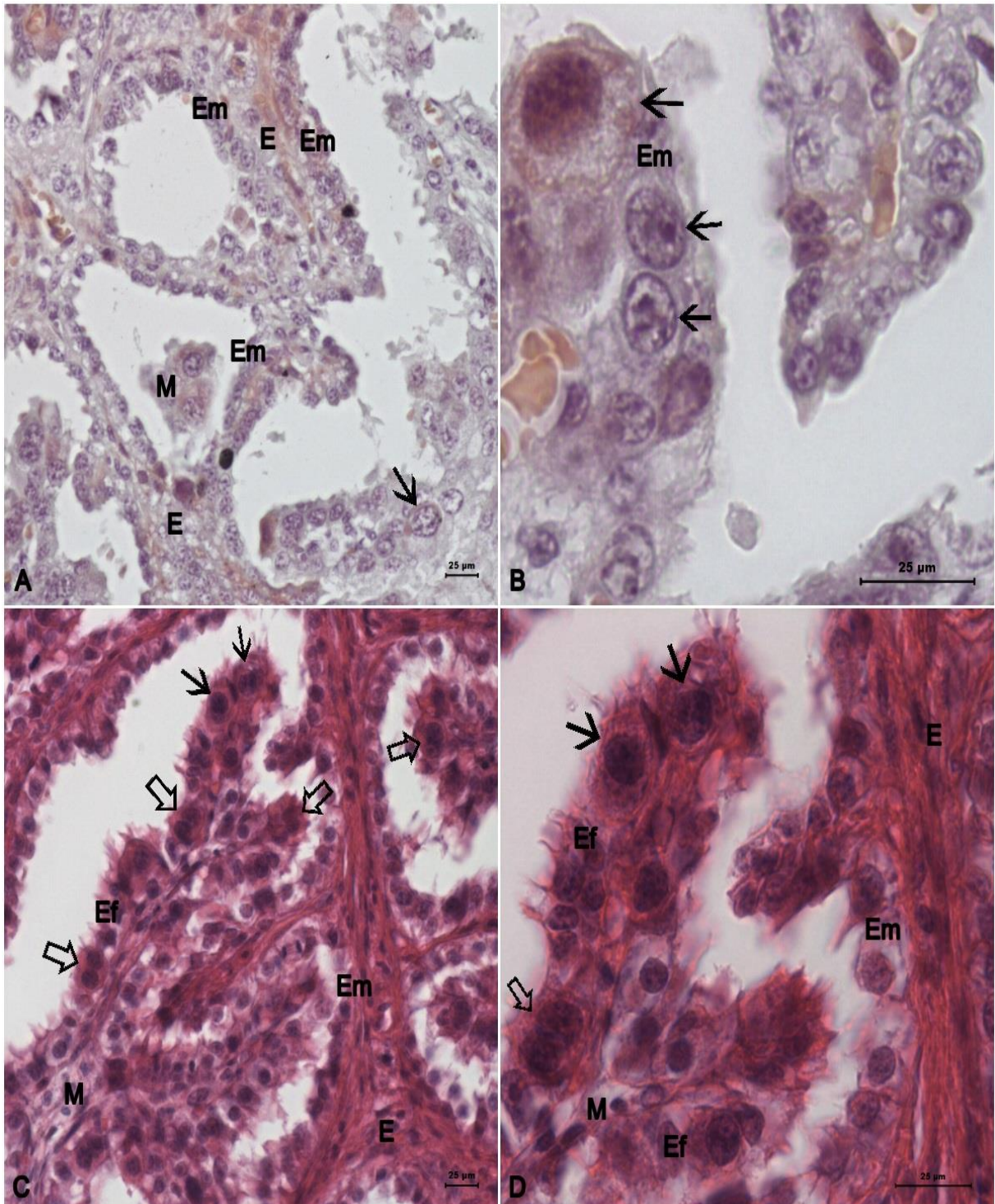
Para as marcações da apoptose, em ambos os grupos e idades gestacionais a marcação positiva foi encontrada predominantemente no epitélio materno em relação ao fetal e nos animais originados de gestações naturais sobre as gestações manipuladas.

Figura 1: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural (A e B) e transgênicos e clonados (C e D) aos 60 dias, coloração Hematoxilina/ Eosina. A) Observa-se a presença de células cuboides e células colunares com células trofoblásticas gigantes – CTG- (seta) e células trofoblásticas gigantes binucleadas – CTGB- (seta vazada). B) Destaque de CTG (seta). C) Destaque de CTGB no tecido fetal (seta vazada). D) Destaque de CTGB (seta vazada) nos tecidos fetais. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 2: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural (A e B) e transgênicos e clonados (C e D) aos 90 dias, coloração Hematoxilina/ Eosina. A) Observa-se a presença de células cuboides e células trofoblásticas gigantes – CTG - (seta). B) Destaque CTG (seta) no epitélio materno. C) Estroma e mesênquima desenvolvidos, CTGs (seta) e células trofoblásticas gigantes binucleadas - CTGB - nos tecidos fetais (seta vazada). D) Destaque de CTGs (seta) e CTGB (seta vazada) nos tecidos fetais. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



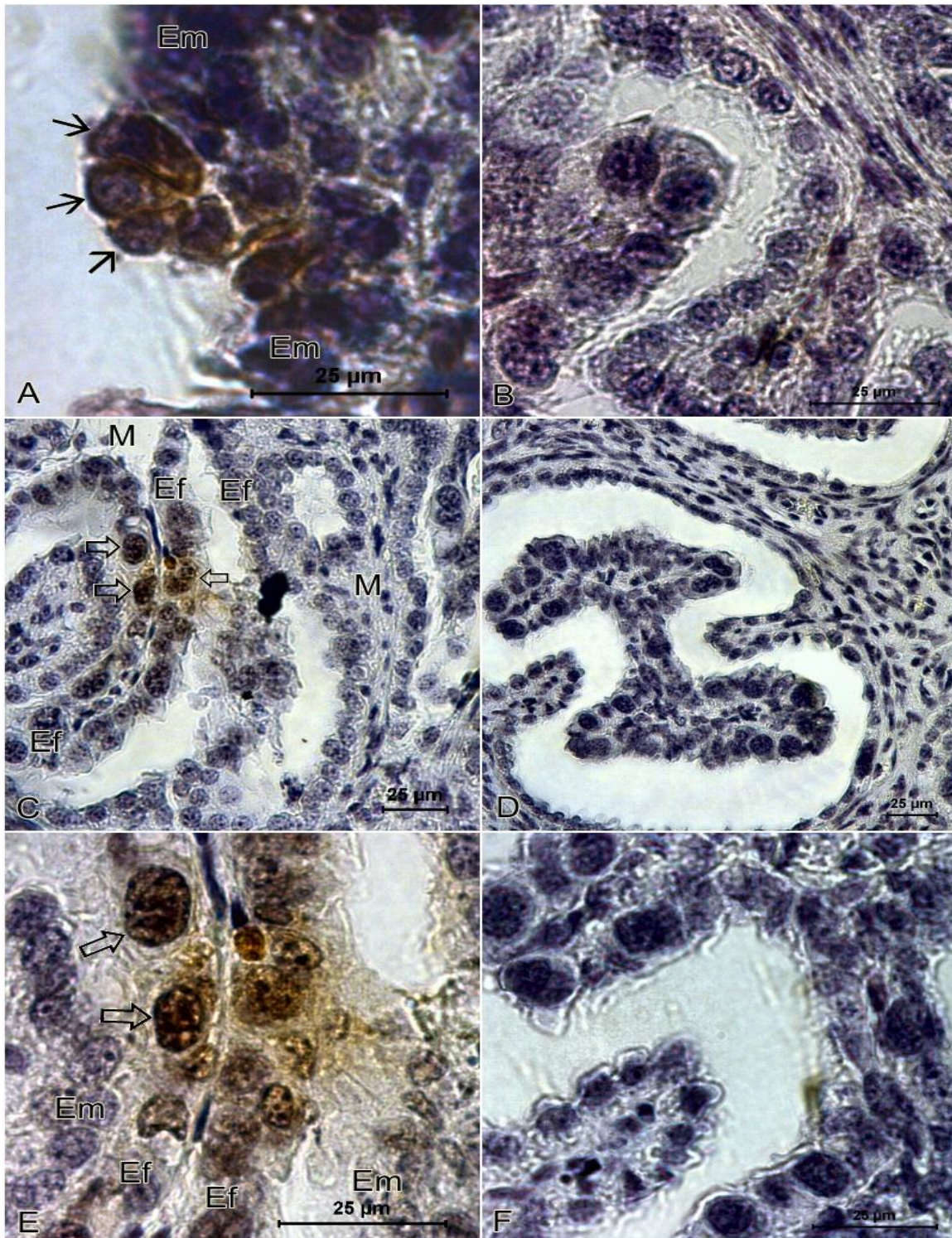
Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Imunorreação também foi observada nas células trofoblásticas gigantes em ambos os epitélios e pouca atividade no estroma endometrial. Não foi observada imunorreação em células do mesênquima, dado que esse possui alta capacidade de diferenciação e por esse motivo apresentam altas taxas de proliferação e apoptose praticamente nula, uma vez que tais tecidos ainda estão em crescimento.

Aos 60 dias, nos animais oriundos de gestações naturais verificou-se a marcação positiva no epitélio uterino (Figura 3 A) e trofoblástico (Figura 3 C e E), sendo no primeiro apenas no citoplasma e no segundo no citoplasma e no núcleo. Reação positiva também foi encontrada nas CTGs no epitélio trofoblástico, assim como na zona de contato entre esse e o epitélio uterino. A morfologia observada nas células apoptóticas foi: cromatina fragmentada e distribuída irregularmente, mas ainda no envelope nuclear (cariorréxe) (Figura 3 E).

Já nos conceitos de 60 dias transgênicos e clonados, por sua vez, observou-se também, mas, com menor intensidade quando comparado com os animais de gestações naturais, marcação no epitélio uterino e trofoblástico, assim como nos animais de gestação natural (Figuras 4 A). Havendo para ambos os epitélios predominância de reação no núcleo, diferentemente dos animais controle que apresentaram também marcação citoplasmática. As CTGs reativas em ambos os epitélios foram encontradas com predominante reação nuclear (Figura 4 A e C) como nos animais oriundos de gestação natural. As células apoptóticas apresentaram morfologia semelhante aos animais controle, com núcleo cariorréxico ou picnótico, não foram observadas células com núcleo picnótico em nenhum outro grupo analisado no experimento. Aos 90 dias, os animais de gestações naturais apresentaram reação positiva ao anticorpo M30 apenas no citoplasma do epitélio materno e na zona de contato entre a mãe e o feto, às vezes apresentando padrão de marcação em fileiras que se estendem ao longo da vilosidade (Figura 5 A e C) e em maior número e intensidade em relação a ambos os grupos de animais de 60 dias. A marcação citoplasmática no envelope nuclear de CTGs das células do epitélio materno apresentou morfologia cariorréxica nas células apoptóticas (núcleos desorganizados, mas ainda envoltos pela membrana nuclear). Notam-se também células reativas isoladas no citoplasma de células do estroma endometrial, fato esse apenas observado neste grupo desta idade gestacional (Figura 5 E).

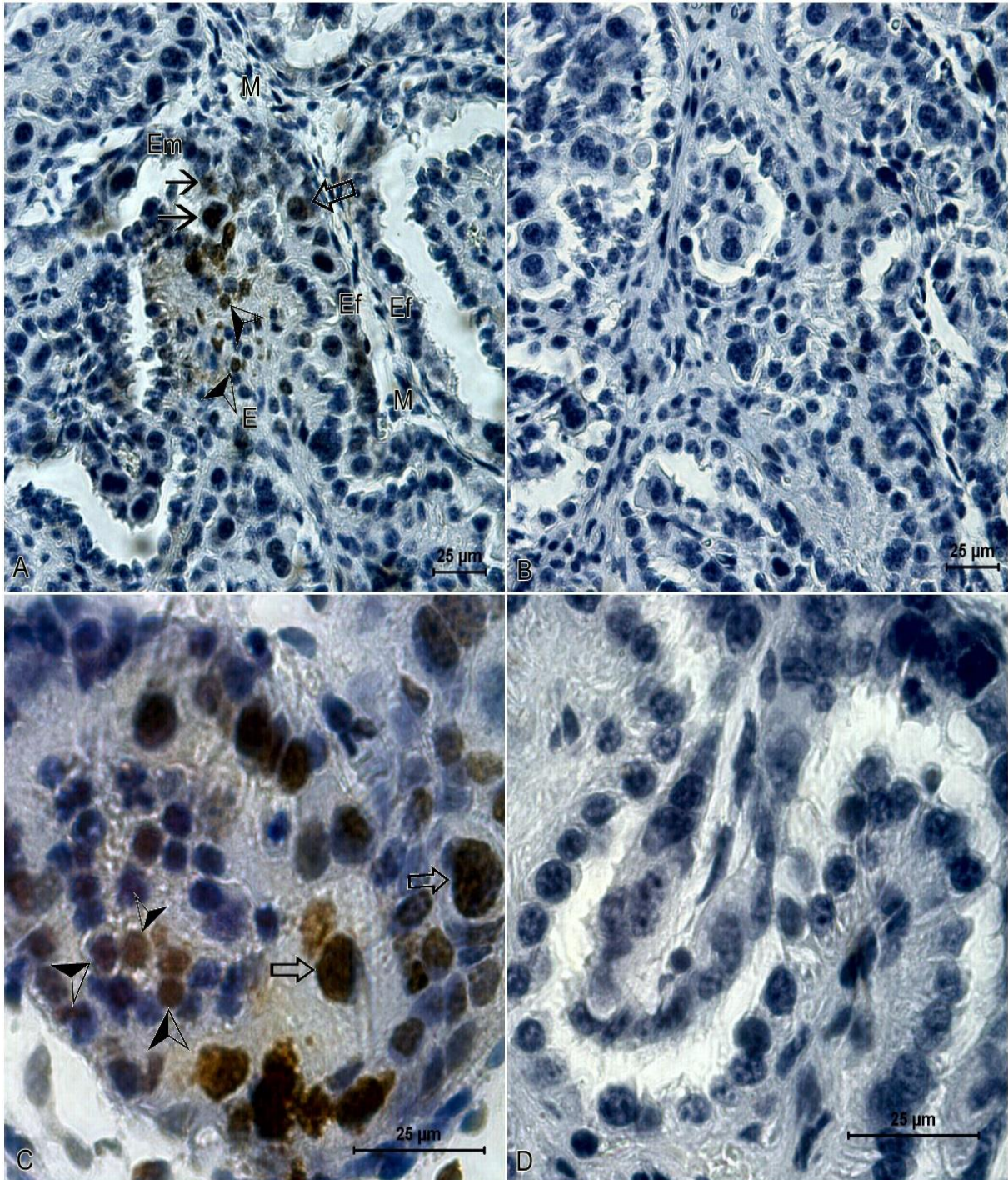
Figura 3: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural de 60 dias, imunohistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade no citoplasma das células epiteliais uterinas (seta). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio trofoblástico com células trofoblásticas gigantes – CTG - reativas (seta vazada). D) Controle negativo de C. E) Detalhe CTG no epitélio fetal na zona de contato entre esse e o materno (seta vazada) com padrão de apoptose de cariorréxe. F) Controle negativo de E. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



Fonte: Dados da pesquisa do autor.



Figura 4: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação de animal transgênico e clonado de 60 dias, imunistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade no núcleo das células epiteliais maternas (seta) e fetais em menor intensidade com células trofoblásticas gigantes – CTG - reativas (seta vazada), fase carriorréxica, corpúsculos apoptóticos (cabeça de seta). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio materno com CTG reativas (seta vazada) em fase picnótica e corpúsculos apoptóticos (cabeça de seta). D) Controle negativo de C. Epitélio fetal (Ef); M (mesênquima); epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

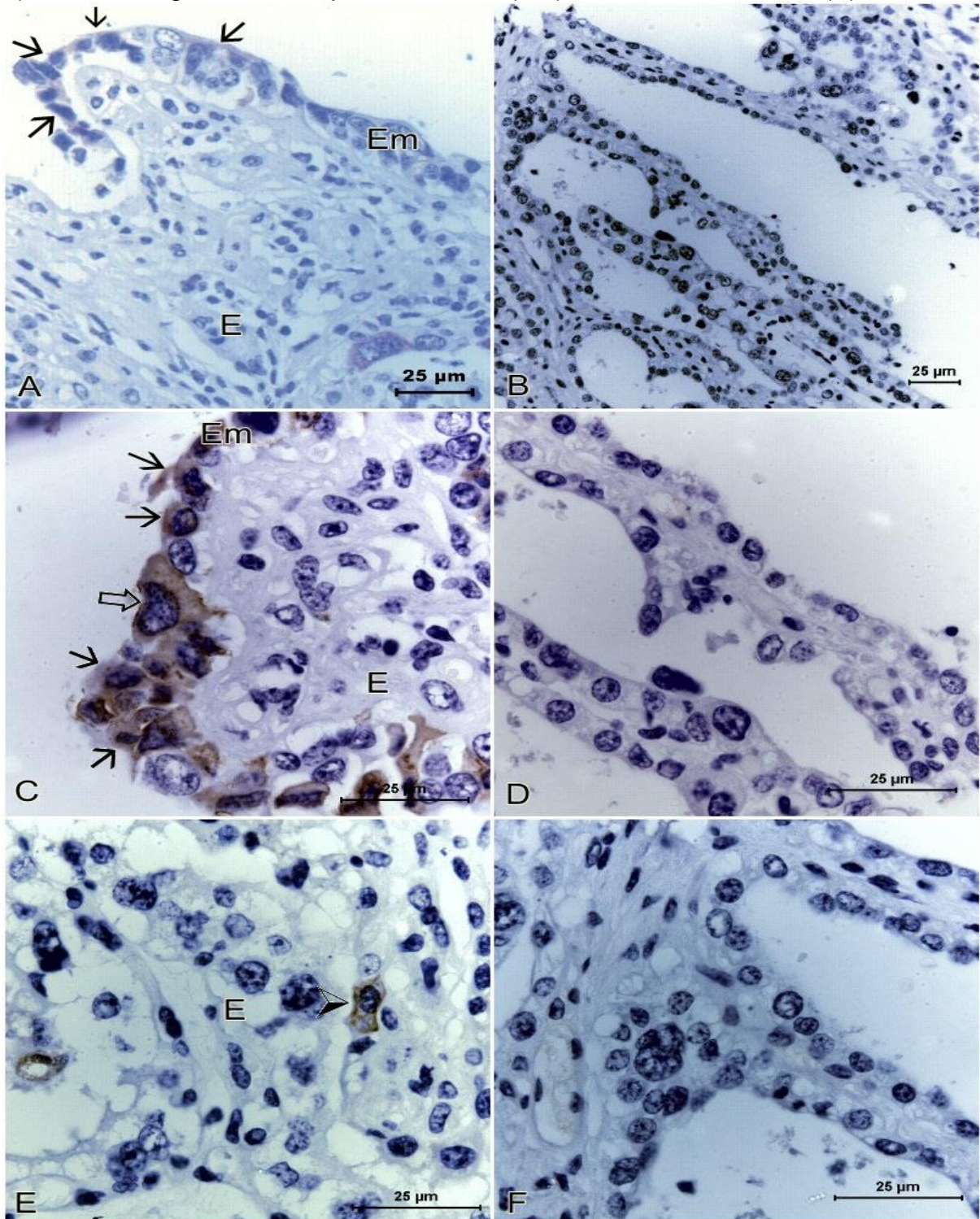
Os tecidos conjuntivos maternos e fetais possuem baixa capacidade de proliferação e essa explica a ocorrência de marcação para apoptose como as encontradas para os animais provenientes de gestações naturais aos 90 dias nesse experimento para manutenção da homeostase tecidual. A imunorreação presente nesse grupo de animais manipulados em laboratório em relação aos de gestação natural, nos sugere também uma falha nos mecanismos de proliferação celular, onde esse, quando aumentado levaria a um acréscimo de eventos apoptóticos.

Variações de proliferação e das taxas de apoptose podem, por sua vez, influenciar a maturação e liberação da placenta e comprometer sua função, levando a estresse fetal, anormalidades no desenvolvimento e ao aborto, como visto frequentemente em gestações de bovinos provenientes de gestações manipuladas em laboratório (BENETONE, 2005; FACCIOTTI et al. 2009). Verificou-se na literatura relatos sobre a marcação em menor intensidade de células do estroma (BOOS; STELLJES, 2000; AUSTGULEN et al., 2002).

Nos conceitos bovinos transgênicos e clonados na mesma idade gestacional, observamos, como nos animais clonados de 60 dias e os controles, a predominância de reação positiva no citoplasma, contudo também verificou-se presença de marcação nuclear no epitélio uterino em menor intensidade em comparação com os animais controle (Figuras 6 A, C, e E) e na zona de contato entre esse e o epitélio fetal. Nesses animais, o padrão de marcação foi semelhante ao encontrados nos animais de gestação natural, com células enfileiradas no epitélio das vilosidades maternas (Figuras 6 A e E). Nos placentônios, como observamos no presente experimento em todos os grupos e idades gestacionais, o epitélio materno apresentou frequentemente maior marcação apoptóticas quando comparados aos tecidos trofoblásticos, isso se deve a sua capacidade mais elevada de crescimento e conseqüentemente de apoptose e indica que tal tecido sofre maior remodelação no início da gestação, resultados que corroboram com a bibliografia consultada (JOSWIG et al., 2003; VON RANGO, 2003).

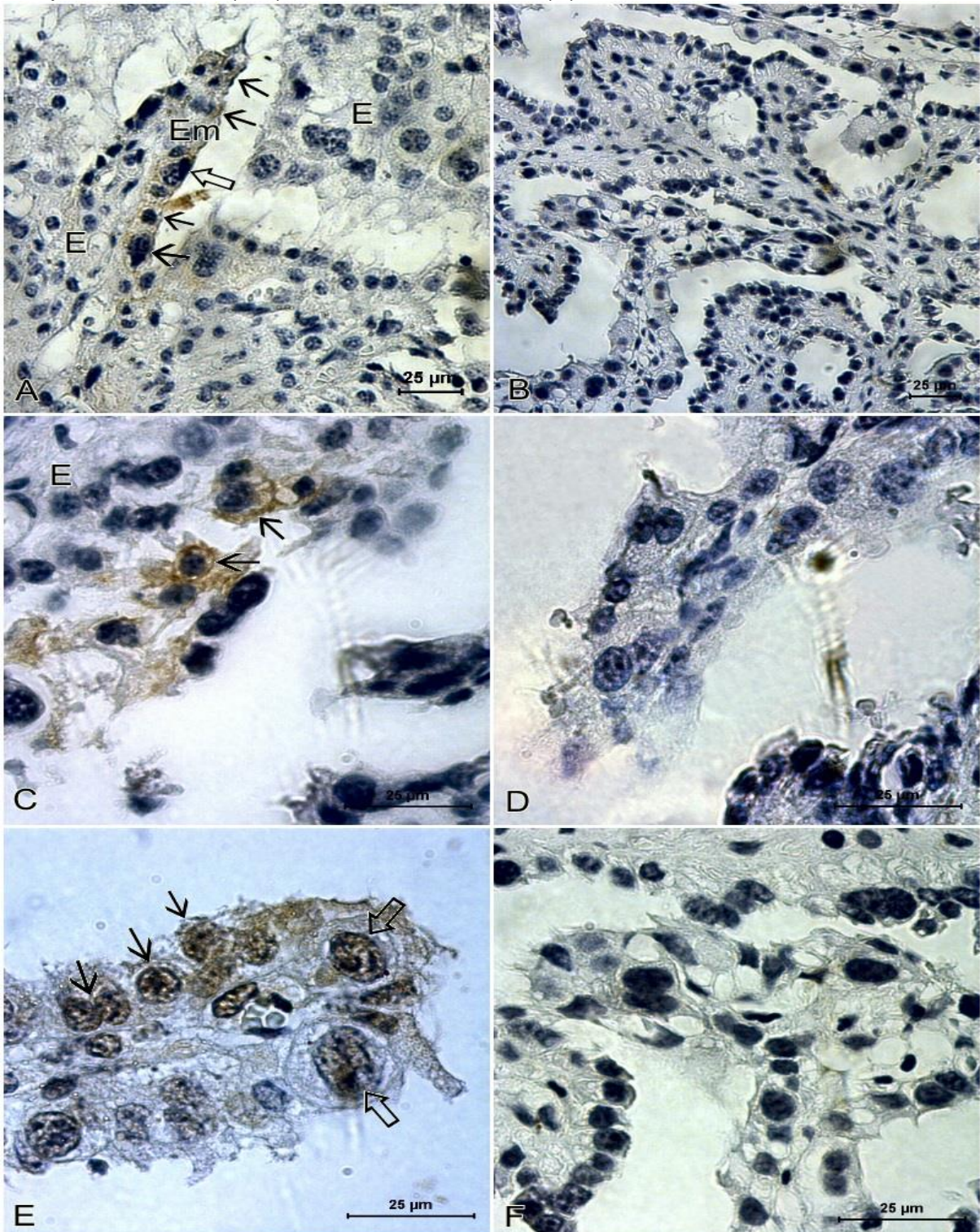
Observou-se também neste trabalho a presença de marcação citoplasmática de CTGs no mesmo epitélio (Figura 6 A), assim como nos demais grupos, porém com maior intensidade nos animais resultantes de gestações naturais. Pela atuação do anticorpo utilizado verificou-se maior reatividade no citoplasma celular, posto que essas são ricas em citoqueratina 18, contudo, verificamos algumas ocorrências de marcação nuclear, fato explicado devido aos eventos apoptóticos terem início no

Figura 5: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação natural de 90 dias, imunohistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade no citoplasma das células epiteliais uterinas, padrão de fileiras (seta), célula reativa no estroma endometrial (cabeça de seta). B) Controle negativo de A. C) Reação positiva da membrana nuclear das células do epitélio materno com padrão enfileirado (seta) e células trofoblásticas gigantes – CTG - reativas (seta vazada). D) Controle negativo de C. E) Detalhe de célula reativa isolada no estroma endometrial (cabeça de seta). F) Controle negativo de E. Epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Figura 6: Fotomicrografias de luz do placentônio de animal de gestação transgênico e clonado de 90 dias, imunoistoquímica para apoptose. A) Imunorreatividade no núcleo e citoplasma das células epiteliais maternas (seta) em fileiras, além de células trofoblásticas gigantes – CTG - (seta vazada) B) Controle negativo de A. C) Reação positiva no núcleo das células do epitélio materno na zona de contato entre esse e o fetal (seta). D) Controle negativo de C. E) Marcação em fileiras no epitélio uterino (seta) com CTGs em fase cariorrética (seta vazada). F) Controle negativo de E. Epitélio materno (Em); estroma endometrial (E).



Fonte: Dados da pesquisa do autor.

citoplasma e continuarem no núcleo, onde a morte celular teria sua consolidação, células em estágios apoptóticos mais avançados apresentariam esta dupla marcação antes da fragmentação nuclear. As células apoptóticas citoplasmaticamente marcadas encontravam-se nos estágios iniciais da cascata apoptótica, logo após a ativação das caspases executoras, posto que a clivagem da caspase mediada da citoqueratina 18 é anterior à ação das endonucleases que atuam sobre o DNA, apresentando assim morfologia apoptótica cariorrética (HUPPERTZ et al., 1999; KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001).

A morfologia observada nas células apoptóticas foi semelhante a dos animais controle, com algumas células com núcleos desorganizados e envelope nuclear pouco evidente (cariorrética). O padrão morfológico das células em apoptose nos placentônios estudados, bem como núcleo cariorrético, picnose e presença de corpúsculos apoptóticos, seguiu às descrições observadas na literatura (KERR et al., 1987; 1995; KERR, 2002).

Em nenhum animal com 90 dias de gestação foi observada reação positiva no epitélio fetal ou mesênquima, tampouco imunorreação no estroma materno, resultados não observados nos animais oriundos de gestação natural ou manipulada em laboratório aos 60 dias, em que foram encontrados no epitélio trofoblástico (Figuras 3 C e 4 A), mesmo que em menor quantidade e intensidade que quando comparadas as marcações nos tecidos maternos, nem no estroma endometrial dos animais transgênicos e clonados aos 90 dias. Isso se deve ao fato de que durante o desenvolvimento placentário ocorre significativa proliferação dos tecidos epiteliais como também aumento de fibras de tecido conjuntivo e vascularização do estroma e mesênquima que contribuem para o aumento em parênquima placentário. Contudo, as taxas de crescimento se desenvolvem de diferentes maneiras durante a gestação nos diferentes tecidos que compõe a placenta e que a remodelação em tais tecidos não era necessária, indicando uma alteração no padrão quando comparada aos animais naturais em relação a homeostase do tecido (BJÖRKMAN, 1954, 1969; REYNOLDS et al., 1990; FERRELL, 1991).

A partir de tais resultados, nota-se que animais clonados possuem um menor número de células apoptóticas e maior número de células em proliferação em comparação com os animais controle, tais eventos são resultado de deficiências placentárias relacionadas à homeostase dos tecidos (RICI et al., 2009). Estes resultados nos confirmam que a menor frequência de apoptose nos placentônios dos

animais manipulados podem contribuir para a ausência de maturação e consequente retenção da placenta, além da ausência de sinais de parto (BRAGA, 2006)

Observamos baixa marcação para apoptose em nosso experimento quanto comparamos esses com relatos na literatura para os estágios finais de gestação; (PFARRER et al., 1999; AUSTGULEN et al., 2002; (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003; STRASZEWSKI-CHAVEZ et al, 2004), revelando que as taxas de apoptose são crescentes no decorrer na gestação e tem um aumento significativo no terço final, sendo esse então um fator determinante para desconexão dos tecidos placentários após o parto, uma vez que se no decorrer da gestação a apoptose está envolvida no remodelamento do órgão e homeostase tissular, ao final ela adquire a função de eliminação das células produtoras de sinais progesteragênicos (PFARRER et al., 1999).

Ensaio sobre apoptose e regulação do desenvolvimento embrionário/fetal continuarão sendo estudados por nosso grupo de pesquisa, a fim de obtermos respostas a nível molecular. As conclusões aqui inferidas podem contribuir com o desenvolvimento da área de neonatologia de ruminantes e biotecnologia na reprodução. Assim, os resultados em conjunto são de grande importância para futuras pesquisas na área de biotecnologia animal, uma vez que podem elucidar fatores que impedem que a técnica de clonagem e transgenia possam ser utilizadas com sucesso em grande escala.

## **6 CONCLUSÕES**

Mediante os resultados observados, podemos concluir existem diferenças entre a marcação para apoptose e seus padrões entre os bovinos de conceptos transgênicos clonados para expressão da proteína fluorescente verde (GFP) e os oriundos de gestações naturais que podem contribuir para explicar a ineficiência das técnicas de clonagem em animais.

## REFERÊNCIAS

- ADEYINKA, F. D.; LAVEN, A.; LAWRENCE, K. E.; VAN DEN BOSCH, M.; BLANKENVOORDE, G.; PARKINSON, T. J. Association between placentome size, measured using transrectal ultrasonography, and gestational age in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 62, n.2, p. 51– 56, 2014.
- ALBERGHINA, L.; COLANGELO, A. M. The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. **BMC Neuroscience**, v. 7, 2006.
- AMARANTES-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15-18, 2003.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760-772, 2009.
- AUSTGULEN, R.; CHEDWICK, L.; ISAKSEN, C. V.; VATTEN, L.; CRAVEN, C. 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**, v. 126, p. 1480-1486, 2002.
- BANTEL, H.; RUCK, P.; GREGOR, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, p. 230-239, 2001.
- BENETONE, M. Z. **Apoptose e proliferação na placenta de búfalas**. 2005. 186f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 184-94, 2009.
- BETTS, D. H. KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55 p.171–191, 2001.
- BJÖRKMAN, N. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta Anatomica**, v.22, p.1-91, 1954.
- BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Record**, v. 163, p. 17-30, 1969.
- 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**, v. 126, p. 469-480. 2003.



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

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS A.; BILODEAU, A. S.; PONTES, J. H. F. ARNOLD, D. FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, S. L. Transgene Expression of Green Fluorescent Protein and Germ Line Transmission in Cloned Calves Derived from In Vitro-Transfected Somatic Cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2013–2023, 2003.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem animal por transferência nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO J. R. ; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 3.ed. São Paulo: Rocca, 2008. p.347-364.

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

BOWEN, I. D. Apoptosis or programmed cell death? **Cell biology international**, v. 17, p. 365-380, 1993.

BRAGA, F. C. **Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CAMPBELL, K.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.; LEE, J. H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 256-268, 2005.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p.46-54, 2004.

CARVALHO, A. F.; KLISCH, K.; MIGLINO, M.A.; PEREIRA, F.T.V.; BEVILACQUA, E. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. **Journal of Morphology**, v. 267, n. 1, p. 50-56, 2006.

CAULÍN, C.; SALVESEN, G. S.; OSHIMA, R. G. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 6, p. 1379-1394, 1997.

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.

CHANG, W. L.; YANG, Y.; ZHANG, H.; LIN, H. Y.; ZHOU, Z.; LU, X.; ZHU, C.; XUE, L. Q.; WANG. H. Role of placenta-specific protein 1 in trophoblast invasion and migration. **Reproduction**, v. 148, p. 343–352, 2014.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 94-100, 2004.

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.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 377-380.

EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.68 p.383-42, 1999

EASTMAN, A. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.121, p. 160-164, 1993.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy and Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.

EWIES, A. A. A.; KHAN, Z. R. Cattle uterus: a novel animal laboratory model for advanced hysteroscopic surgery training. **Obstetrics and Gynecology International**, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ogi/2015/967693/cta/>>. Acesso em: 8 set. 2015.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, p.221-231, 2005.

FACCIOTTI, P. R. RICI, R. E.; MARIA, D. A.; BERTOLINI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v.7 p.25. 2009.

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.

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

FLEMMING W. Säugethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. **Arch. Anat. Entwickl**, p. 221-44, 1885.

GONSALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Ed. Varela, 2001. p. 281-294.

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

GUDMUNDSSON, S.; DUBIEL, M.; SLADKEVICIUS, P. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. **Seminars in Perinatology**, v. 33, p. 270-280, 2009.

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.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; 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.

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- 42 trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HOYES, A. D. The endometrial glands of the pregnant sheep: a ultrastructure study. **J. Anat.**, v. 111, p. 55-67, 1972.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; REISTER, F.; KINGDOM, J.; KORR, H.; KAUFMANN, P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. **Lab Invest.**, v. 79, n. 12, p. 1687-1702, 1999.

IBGE. **Pesquisa pecuária municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=20&i=P&c=73>>. Acesso em: 29 fev. 2015.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas: a minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3-4, p. 185-98, 2006.

IGWEBUIKE, U. M. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p.1-7, 2009.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 185-193, 2000.

JENKINSON, J. W. **Vertebrate embryology**. London: Oxford University Press, 1925. p.193-232.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 139-163, 2005.

JOSWIG, A.; GABRIEL, H. D.; KIBSCHULL, M.; WINTERHAGER, E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-9, 2003.

KADYROV, M.; KAUFMANN, B.; HUPPERTZ, B. Expression of a cytokeratin 18 neoepitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. **Placenta**, v. 22, p. 44-48, 2001.

KAIDI, R.; BROWN, P. J.; DAVID, J. S.; ETHERINGTON, D. J.; ROBINS, S.P. Uterine collagen during pregnancy in cattle. **Veterinary Research**, v. 26, p. 87-91, 1995.

KATHIRESAN, R.; RAJASUNDARAM, R. C.; PATTABIRAMAM, S. R. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, v. 55, p. 326-328, 1992.

KERR J. F.; SEARLE J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain 34 numerous mitotic figures. **J. Pathol.**, v. 107, p. 41-4, 1972.

KERR, J. F. R. History of events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 181-182, p. 471-474, 2002.

KERR, J. F. R.; GOBÉ, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death, In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. (Ed.). **Cell death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 1-39.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J.; HARMON, B. V.; BISHOP, C. J. Apoptosis. In: PERSPECTIVES on mammalian cell death. Oxford: Oxford University Press, 1987. p. 93-128.

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

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFMANN, 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.

KRUIP, TH. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.

LANG, C. Y.; HALLACK, S.; LEISER, R.; PFARRER, C. Cytoskeletal filaments and associated proteins during restricted trophoblast invasion in bovine placentomes: light and transmission electron microscopy and RT-PCR. **Cell and Tissue Research**, v. 315, n. 3, p. 339-348, 2004.

LEERS, M. P. G.; KÖLGEN, W.; BJÖRKLUND, V.; BERGMAN, T.; TRIBBICK, G.; PERSSON, B.; BJÖRKLUND, P.; RAMAEKERS, F. C. S.; BJÖRKLUND, B.; NAP, M.; JÖRNVALL, H.; SCHUTTE, B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. **Journal of Pathology**, v.187, p. 567-572, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 364-377.

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

LU, M.; LAWRENCE, D. A.; MARSTERS, S.; ACOSTA-ALVEAR, D.; KIMMIG, P.; MENDEZ, A. S.; PATON, A. W.; PATON, J. C.; WALTER, P.; ASHKENAZI, A. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. **Science Magazine**, v. 345, n. 6192, p. 98-101, 2014.

MACINTYRE, D. M.; LIM, H. C.; RYAN, K.; KIMMINS, S.; SMALL, J. A.; MACLAREN, L. A. Implantation-Associated Changes in Bovine Uterine Expression of Integrins and Extracellular Matrix. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1430-1436. 2002.

MAIORKA, P. C.; FAVARON, P. O.; MESS, A. M.; SANTOS, C. R.; ALBERTO, M. L.; MEIRELLES, F. V., MIGLINO, M. A. Vascular Alterations Underlie Developmental Problems Manifested in Cloned Cattle before or after Birth. **Plos One**. v. 10, n. 1, 2015.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues, and disease: principles of general pathology**. Cambridge, Mass.: Blackwell Science, 1996. p. 175-227.

MARTINS, V. M. V.; MARQUES JUNIOR, A. P.; VASCONCELOS, A. E.; MARTINS, E.; SANTOS, R. L.; LIMA, F. P. C. Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 56 p. 157-167, 2004.

MEÇA, K. K. O. L.; DEL PUERTO, H. L.; RODRIGUES, L. V; MILENE A. RACHID, M. A.; PEREIRA, N. B., CÂNDIDO, M. G. L.; VASCONCELOS, A. C. Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidênciação imuno-histoquímica e bioquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 718-722, 2011.

MIGLINO, M. A. Clonagem animal e placentação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Supl. 32, p.75-78, 2004.

MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A. F.; MANÇANARES, C. A. F.; PEREIRA, F. T. V.; AMBRÓSIO, C. E. Imunolocalização de receptores de progesterona nas células trofoblásticas gigantes binucleadas na placenta de búfalo (*Bubalus bubalis*). **Biotemas** (UFSC), v. 20, p. 99-106, 2007a.

MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. Vasculature of bovine placentas studied by scanning electron microscopy of corrosion casts. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 97, n. 1, p. 23-35, 1992.

MIGLINO, M. A.; KLISCH, K.; G, S.; LEISER, R. Genome multiplication in trophoblast giant cells of sheep, goat, water buffalo and deer: an image cytophometric study.. **Reproduction in Domestic Animals**, USA, v. 35, p. 145-48, 2000.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; AMBRÓSIO, 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, n. 4, p. 604-617, 2007b.

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

MONTEIRO, C. M. R.; FARIAS, E. C.; PERRI, S. H. V.; SOUZA, W. M. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40; p. 45-54, 2003.

MORRIS, D. G.; DISKIN, M. G.; SREENAM, J. M. Biotechnology in cattle reproduction. **Beef Production**, n. 39, 2001.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. v.1. New Brunswick: Rutgers Press, 1987. 383 p.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation Experimental. **Cell Research**, v. 256, p. 12–18, 2000.

NI, W.; QIAO, J.; MA, Q.; WANG, J. WANG, D.; ZHAO, X.; CAO, Y.; LI, Q.; HU, S.; CHEN, C. Development of sheep kidney cells with increased resistance to different subgenotypes of BVDV-1 by RNA interference. **Journal of Virological Methods**, v. 218, p. 66–70, 2015.

OKOUCHI, M.; EKSHYYAN, O.; MARACINE, M.; AW, T. Y. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 8, p. 1059-96, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; RAMOS, E. M.; CAVALCANTE, T. V.; MARUO, V. M. Caracterização histológica da placenta de zebuínos criados na Amazônia oriental. **Acta Veterinária Brasília**, v. 4, n. 2, p. 100-104, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). **Placenta**, v. 27, n.1, p. 87-97, 2006.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M. FORSBERG, E. J.; GARBER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPAMG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, P. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 334-339, 2002.

PEREIRA, F. T. V.; BRAGA, F. C.; BURIOLI, K. C.; KFOURY JR, J. R.; OLIVEIRA, L. J.; PAPA, P. C.; CARVALHO, A. F.; AMBROSIO, C. E.; BAZER, F. W.; MIGLINO, M. A. Transplacental transfer of iron in the water buffalo (*Bubalus bubalis*): uteroferrin and erythrophagocytosis. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 45, p. 907-914, 2010.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A. F.; BEVILACQUA, E. Development of placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis*) – Linnaeus, 1758. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v. 38, p. 151-154, 2001.

PEREIRA, F. T. V.; OLIVEIRA, L. J.; BARRETO, R. S. N.; MESS, A.; PERECIN, F.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; MIGLINO, M. A.; PIMENTEL, J. R. V.; FANTINATO NETO, P.; MEIRELLES, F. V. Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. **PLoS One**, v.8, n.5, 2013.

PFARRER, C.; HIRSCH, R.; GUILLOT, M. LEISER, R. Interaction of integrin receptors extracelular matrix is involved in trophoblastic giant cell migration in bovine placentomes. **Placenta**, v. 24, p. 588-597, 2003.

PFARRER, C.; WIRTH, C.; SCHULER, G.; KLISCH, K.; LEISER, R.; HOFFMAN, B. Frequency, ultrastructural features, and relevance of apoptosis in the bovine placenta. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 222, 1999.

PINTO, L. M.; AMBRÓSIO, C. E.; TEIXEIRA, D. G.; ARAÚJO, K. P. C.; KFOURY JÚNIOR, J. R.; MORINI JUNIOR, J. C.; MORINI, A. C.; RICI, R. E. G.; FERREIRA, G. J. B. C.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A. Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (*Bos indicus* – Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n.2, p. 110-121, 2008.

PTAK, G.E.; TOSCHI, P.; FIDANZA, A.; CZERNIK, M.; ZACCHINI, F.; MODLINSKI, J. A.; LOI, P. Autophagy and apoptosis: parent-of-origin genome-dependent mechanisms of cellular self-destruction. **Open Biol.**, v. 4, n. 6, 2014.

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

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nature reviews. **Genetics**, v. 2, p. 21-32, 2001.

REYNOLDS, L. P.; MILLAWAY, D. S.; KIRSCH, J. D.; INFELD, J. E.; REDMER, D. A. Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 213–222, 1990.

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

RICI, R. E., 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. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 115, p. 29-38, 2009.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetric and genital diseases (theriogenology)**. 3.ed. Woodstock: David and Charlies, 1986. 986p.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p. 229-233, 2007.

SANTOS, T. C.; PEREIRA, F. T. V.; ASSIS NETO, A.C.; AMBROSIO, 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.

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

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 (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal Animal Science**, v. 53, n. 9, p. 964-967, 1983.

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

SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 23-30, 2001.

SPANOS, S.; RICE, S.; KARAGIANNIS, P.; TAYLOR, D.; BECKER, D. L.; WINSTON, R. M.; HARDY, K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 124, p. 353–363, 2002

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A. BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 537-550, 2004.



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. **Anatomy of the placental barrier**: comparative placentation: essays in structure and function. London: Academic Press, 1975. p.25–27.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M.; FUNAI, E. F.; MOR, G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. **Mol. Hum. Reprod**, v. 10 p. 33-41, 2004.

THOMPSON, J. G. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. **J. Reprod. Dev.**, v. 52, p. 169-175, 2006.

VON RANGO, U.; KRUSCHE, C. A., KERTSCHANSKA S, ALFER J, KAUFMANN P, BEIER, H. M. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. **Placenta**, v. 24, p. 924-940, 2003.

WANG, Y.; LI, L.; WANG, C. C.; LEUNG, L. K. Effect of zeranol on expression of apoptotic and cell cycle proteins in murine placentae. **Toxicology**, v. 314 p.148–154, 2013.

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. Animal cloning: problems and prospects. **Revue Scientifique et Technique**, v. 24, n. 1, p. 251-264, 2005.

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

WOLTER, K. G. Hsu, Y. T.; Smith, C. L., Nechushtan, A.; Xi, X. G.; Youle, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 139 p. 1281–1292, 1997.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R.B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, v. 17, n. 1, p. 75-86, 1996.

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 Anatomica**, n. 22, p. 134-139, 1982.

WYLLIE, A. H.; KERR, A. H.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheather histologia funcional**: texto e atlas em cores, 4. ed. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 409 p.

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.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, v. 19, p. 124-128, 2004.