

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

**PROLIFERAÇÃO CELULAR EM GESTAÇÕES NATURAIS E
DE CONCEPTOS BOVINOS TRANSGÊNICOS E
CLONADOS, QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA
FLUORESCENTE VERDE (GFP)**

Fernanda Paes de Oliveira

Zootecnista e Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

**PROLIFERAÇÃO CELULAR EM GESTAÇÕES NATURAIS E
DE CONCEPTOS BOVINOS TRANSGÊNICOS E
CLONADOS, QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA
FLUORESCENTE VERDE (GFP)**

Fernanda Paes de Oliveira

Orientadora: Profa. Adjunta Flávia Thomaz
Verechia Pereira

Dissertação apresentada ao Câmpus
Experimental de Dracena – Unesp, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvida pela Biblioteca do Campus Experimental de Dracena

O482p Oliveira, Fernanda Paes de.
Proliferação celular em gestações naturais e de conceptos bovinos transgênicos e clonados, que expressam a proteína fluorescente verde (GFP) / Fernanda Paes de Oliveira. – Dracena: [s.n.], 2015
48 f. il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Dracena. Área de conhecimento: Produção Animal, 2015.

Orientadora: Flávia Thomaz Verechia Pereira

1. Clonagem. 2. Placenta. 3. Bovino -- Placentação. 4. Ruminante. 5. Animais transgênicos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Verificação da Proliferação Celular em Gestações Normais e de Conceptos Bovinos Clonados Transgênicos, que Expressam a Proteína Fluorescente Verde (GFP)

AUTORA: FERNANDA PAES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA
Coordenadora Executiva / Unidade de Dracena



Prof. Dr. RICARDO DA FONSECA
Coordenadora Executiva / Unidade de Dracena



Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 10 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernanda Paes de Oliveira - nascida em 02 de fevereiro de 1984, na cidade de Murutinga do Sul/SP - Brasil, filha de José Paes de Oliveira e Leila Figueiredo Giuntini de Oliveira. Em fevereiro de 2008, conclui a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS - UEMS - Brasil e a graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, Andradina, SP- FCAA - Brasil. Em março de 2013, 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 Interunidades do Câmpus Experimental de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de Morfofisiologia da Placenta e Embrião de Ruminantes, como bolsista CAPES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me ajudado a realizar mais um sonho na minha vida.

Ao incentivo da minha família em especial minha mãe Leila Figueiredo Giuntini pela força e perseverança.

A minha orientadora Professora Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira, pela compreensão e ensinamentos ministrados, no qual pude amadurecer e aprender a lidar com diferentes situações da vida acadêmica; exemplos que levarei como modelo na minha vida.

Ao professor Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello, pelo incentivo e apoio para realização desta Pós-Graduação, além de conselhos e auxílio na vida acadêmica.

Ao professor Dr. Ricardo da Fonseca pelo apoio na execução de atividades acadêmicas, pela amizade e apoio.

Ao Grupo do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião “L@MPE”, a técnica de laboratório Miriam Faria e Ariane e os amigos colaboradores, Bruna Vasconcelos, Vitor Trinca e Gabriele Oliveira pelo apoio, trocas de experiências e momentos de descontração, alegria e risos.

Aos funcionários da Unesp de Dracena, pela atenção, carinho e apoio.

Meus agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro para a execução das minhas atividades acadêmicas.

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 pelo profissionalismo.



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 Zootechny of Unesp Dracena).

Dracena, 11 de abril de 2006

Prof. Dr. Fabio Erminio 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 Roberto de Barros (SP 294) km 651 - Dracena - SP CEP: 17900-000

Fone: (13) 3441-0000 Fax: (13) 3441-0000

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAB	Peroxidase substrato
FZEA-USP	Faculdade de Zootecnia e Engenharia Ambiental da Universidade de São Paulo
GFP	Proteína de fluorescência verde
IA	Inseminação artificial
LMMD	Laboratório Morfofisiologia Molecular de Desenvolvimento
MIV	Maturação In Vitro
NAHCO ₃	Bicarbonato de sódio
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
PBS	Tampão Fosfato
Te	Transferência de Embrião
TN	Transferência Nuclear
µg	0,000001 g
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 60 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal e uterino. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em maior aumento da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada circundada (destaque) com imunorreatividade específica, pois apenas um núcleo estava reativo ao anticorpo. d) Controle negativo de b. a,b: barra=100µm; c,d: barra=20µm. Seta cheia, epitélio fetal; seta interrompida, epitélio uterino; (●) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial).....32

Figura 2 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 60 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal e uterino, com maior evidência no epitélio fetal. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em aumento 100x da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada com imunorreatividade nos dois núcleos. d) Controle negativo de c. Célula binucleada com apenas um núcleo reativo (★); célula binucleada reativa (seta cheia); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em).....33

Figura 3 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA); placentônios bovinos de conceitos clonados transgênicos, 60 dias de gestação. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal, e, como nos animais de gestação natural, observamos também a marcação específica do anticorpo, no qual apenas um núcleo da célula binucleada estava reativo (seta interrompida). b) Controle negativo de a. c) Célula binucleada reativa representada pela seta cheia; célula binucleada com apenas um núcleo reativo (seta interrompida); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em); M (mesênquima).....34

Figura 4 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 90 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em aumento 100x da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada, seta cheia. d) Controle negativo de c. Seta indicando o epitélio fetal; (x) epitélio materno, (●) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial).....37

Figura 5 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA); placentônios bovinos de conceitos clonados transgênicos, 90 dias de gestação. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal, e, como nos animais de gestação natural, observamos também a marcação específica do anticorpo, no qual apenas um núcleo da célula binucleada estava reativo (seta interrompida). b) Nesta fotomicrografia de luz podemos observar a interação materno-fetal (elipse). Célula binucleada não-reativa (★); célula binucleada reativa (seta cheia); mesênquima (M); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em).....38

PROLIFERAÇÃO CELULAR EM GESTAÇÕES NATURAIS E DE CONCEPTOS BOVINOS TRANSGÊNICOS E CLONADOS, QUE EXPRESSAM A PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP)

RESUMO - Para o crescimento placentário e a nutrição fetal, altas taxas de crescimento e diferenciação celular são necessárias para um balanço adequado entre proliferação e morte celular das células placentárias. Estas células possuem propriedades específicas em relação a suas funções metabólicas, endócrinas e angiogênicas, sendo fundamentais para o desenvolvimento do conceito ao longo da prenhez. Neste estudo, foi avaliada a ocorrência de proliferação celular em placentônios provenientes de conceptos bovinos transgênicos clonados (n=5) e de inseminação artificial (IA) (n=18), nos períodos de 60 e 90 dias de gestação, que tiveram seu desenvolvimento interrompido e houve a recuperação do útero gestante. As amostras de placentônio foram recortadas e fixadas em solução aquosa de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M pH 7.4, para verificação da morfologia, e realização da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados obtidos foram comparados entre bovinos clonados transgênicos e de IA. Em todos os grupos e períodos gestacionais, o epitélio fetal apresentou marcação positiva para proliferação celular. Aos 60 dias a marcação positiva no epitélio uterino das gestações manipuladas foi pouco evidente em relação às de gestações naturais. Por sua vez aos 90 dias a imunorreatividade dos placentônios dos conceptos clonados, foi muito intensa não só no epitélio, mas também no tecido conjuntivo fetal, fato não observado na gestação natural, onde a reação positiva foi pouco evidente no tecido conjuntivo fetal. Neste estudo foi demonstrado um possível desequilíbrio nos padrões de proliferação celular nos conceptos bovinos clonados transgênicos, pois no início da gestação (60 dias) apresentaram menor atividade proliferativa 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 proliferação celular, nas fases de gestação estudadas, e seu entendimento são, portanto, 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: Clonagem, PCNA, Placenta, Prenhez, Ruminantes, Transgenia

CELL PROLIFERATION IN PREGNANCIES NATURAL AND TRANSGENIC CONCEPTOS CATTLE AND CLONED, EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)

ABSTRACT – For the placental growth and fetal nutrition, high rates of growth and differentiation are necessary for a proper balance between proliferation and cell death of placental cells. These cells have specific properties in relation to its metabolic, endocrine and angiogenic function and they are fundamental to the development of the fetus throughout pregnancy. In this study, the occurrence of cell proliferation was assessed in placentomes by cloned transgenic bovine conceptuses (n=5) and by artificial insemination (AI), in the 60 and 90 days of gestation, and they development were interrupted and recovering the pregnant uterus. The samples were cut and fixed in paraformaldehyde 4% aqueous solution in sodium phosphate buffer (PBS) 0.1M at pH 7.4, for verification of the morphology and performing immunohistochemistry. The results were compared with bovine cloned and AI. The results obtained were compared between transgenic cloned bovine conceptuses and AI. In all groups and gestational periods, the fetal epithelium presents positive labeling to cell proliferation. In 60 days gestation the positive labeling of the manipulated gestations was less evident in relation to the natural gestations. On the other hand, in 90 days gestation the immunoreactivity of the placentomes of the cloned conceptuses was more intense, not just in the epithelium, but also in the fetal connective tissue, fact not observed in the natural gestation, where the positive reaction was less evident in the fetal connective tissue. In this study was noted a possible imbalance in the patterns of the cell proliferation in the transgenic cloned bovine conceptuses, because in the early gestation (60 days) they presented a lesser proliferative activity, and in the 90 days a increase, may be this fact one of the factors leading to placental abnormalities. Therefore, the results of verification of cell proliferation and understanding are important for the understanding of possible fails in gestational development, leading to fetal and placental abnormalities in advanced techniques of embryonic manipulation, such as the production of cloned and transgenic animals.

Keywords: Cloning, PCNA ,Placenta, Pregnancy, Ruminants, Transgenesis

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A placenta bovina.....	14
2.2 Transgenia e clonagem animal.....	19
2.3 Proliferação celular.....	22
3 OBJETIVO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção das células com expressão da proteína fluorescente verde (GFP).....	28
4.2 Técnica de imuno-histoquímica.....	29
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte brasileira caracteriza-se pela criação extensiva associada ao baixo uso de insumos, mesmo com os confinamentos bovinos estando em ascensão no país. Porém parte desse sistema de criação levou a uma preocupação ambiental, conduzindo a pecuária brasileira a ter um perfil mais tecnológico. Diante deste contexto diversas pesquisas são desenvolvidas direcionadas ao aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos (FACCIOTI et al., 2009).

Aspectos reprodutivos como atraso na idade ao primeiro parto, falhas na detecção de cio, aumento no intervalo entre partos, retenção placentária, nascimento de bezerros fracos, estão diretamente relacionados à lucratividade do plantel de bovinos no Brasil (SANTOS; BELETTI, 2012). Neste contexto é importante conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários, com a finalidade de minimizar estes problemas relacionados à reprodução e produção de bovinos

Com a finalidade de aprimorar as técnicas de produção animal, a utilização de biotécnicas reprodutivas como produção de animais transgênicos ou clonagem animal por transferência nuclear (TN), estão sendo usadas com propósitos científicos e/ou comerciais. Entretanto, esta tecnologia está frequentemente associada às anormalidades gestacionais. Estas falhas estão relacionadas principalmente com a receptora do embrião e ao desenvolvimento alterado de sua placenta (PEREIRA; FREITAS, 2009).

A ampla utilização destas biotécnicas de reprodução e produção animal, especialmente a clonagem, demonstrou que a placentação é um dos processos mais comprometidos, pois durante a placentação de bovinos clonados ocorrem alterações anatômicas que provavelmente contribuem para suas baixas taxas de nascimento (MIGLINO et al., 2007).

Para que ocorra um desenvolvimento placentário normal, o útero sofre várias alterações morfológicas, e a placenta passa por um intenso processo de proliferação celular, crescimento vascular placentário e interação materno-fetal (PFARRER et al., 2006). O estudo da estrutura morfológica macroscópica e histológica da placenta é de grande importância, pois pesquisas nesta área podem fornecer subsídios para a

intervenção mais eficaz em casos de patologias puerperais. Tais alterações podem estar relacionadas a uma imperfeição da placenta durante seu desenvolvimento (OLIVEIRA, 2007).

Diante deste contexto o presente trabalho auxiliará no entendimento de possíveis falhas gestacionais, uma vez que a ocorrência de abortamentos e retenção placentária têm sido relatadas como fruto de falhas no desenvolvimento embrionário/fetal e placentário. Sendo a proliferação celular uma das possíveis causas na compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento placentário/fetal, pois em seus parâmetros normais desempenha um papel importante no desenvolvimento inicial da placenta bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Placenta bovina

A placenta é provavelmente o órgão mais variável em sua estrutura de qualquer outro órgão de mamíferos (MOSSMAN, 1937). De acordo com Mossman (1987), a placenta é uma estrutura onde ocorre a aposição entre o tecido materno e o tecido fetal que permite executar as trocas fisiológicas. Hafez e Hafez (2004), define a placenta como a justaposição ou fusão das membranas fetais com o endométrio, sendo resultante de várias interações entre a mãe e o feto, estando ligada ao embrião pelo cordão umbilical. Do ponto de vista morfológico funcional, um órgão complexo, que no curso de seu desenvolvimento apresenta não somente modificações quantitativas e qualitativas de sua estrutura macroscópica geral, mas também diversas modificações microscópicas (OLIVEIRA et al., 2006).

Entre a placenta e o feto, existem alguns tecidos que separam a circulação materna da fetal, sendo do lado materno, os vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e epitélio, e do lado fetal o epitélio coriônico, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Estudos realizados com microscopia eletrônica na placenta dos ruminantes mostraram células binucleadas do cório fetal que migraram formando um “aspecto sincicial” na união do tecido materno com o fetal, por isso os autores a reclassificaram de epiteliocorial para sinepiteliocorial (LEISER; KAUFMANN, 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Quanto à sua anatomia macroscópica, a placenta bovina é caracterizada como cotiledonária, devido à presença de unidades funcionais chamadas placentônios. Existem duas áreas principais na placenta, a interplacentomal, relacionada com transferência histotrófica e a região placentomal que atua na troca hemotrófica de nutrientes e metabólitos (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). Nesta região os tecidos maternos e fetais estão intimamente conectados através de estruturas conhecidas como carúnculas e cotilédones (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFMANN, 1994), o que aumenta grandemente a área de contato superficial entre a parte materna e fetal.

As carúnculas são espessamentos do tecido sub-epitelial do útero. Nas vacas sua morfologia é convexa, e estão presentes em toda a gestação, no início apresenta um aspecto liso e a partir da metade até o estágio final torna-se esponjosa devido às criptas (RAM; CHANDRA, 1984). Entre as carúnculas existe uma área conhecida como intercaruncular, nas quais estão presentes as glândulas uterinas. Durante a gestação as carúnculas se conectam com as proliferações do cório, os cotilédones, estes possuem uma forma ovóide, com enormes “tufos” de vilos oriundos do cório fetal. A união da carúncula e o cotilédone dá origem a unidade morfofuncional da placenta conhecida como placentônio (CARTER; ENDERS, 2004).

O placentônio é o local predominante de trocas de nutrientes e gases entre a mãe e o feto (MIGLINO; DIDIO, 1992). Sua formação inicia-se com o crescimento do trofoblasto e a formação de vilosidades coriônicas, que depois são preenchidas por mesênquima vascular. As vilosidades fetais começam a preencher as depressões carunculares (criptas uterinas) e com este crescimento o trofoblasto forma um arranjo semelhante a uma árvore, que se ramificam com o avançar da gestação (BJÖRKMAN, 1969). Nesse processo ocorre a hipertrofia do endométrio crescendo ao redor da vilosidade, resultando no placentônio. Essa interdigitação produz uma firme aderência entre as porções fetal e materna.

Na placenta bovina, os placentônios estão dispostos em quatro fileiras, acompanhando o arranjo nas carúnculas uterinas: quatro fileiras no corpo do útero, três no centro e dois na extremidade dos cornos uterinos, o seu formato pode ser circular, elíptico ou quadrangular, sendo a maioria ovóide e, em alguns casos, pode ocorrer fusão de placentônios vizinhos (MIGLINO, 1991). Além da sua morfologia, o número também é variável, sendo no corno gestante sempre maior que no corno

não gestante. Miglino (1991) relatou que a média em *Bos taurus* é de 88 com o mínimo de 54 e máximo de 147 placentônios. O tamanho depende do estágio gestacional, ocorrendo um aumento de tamanho no decorrer da gestação, com um maior crescimento durante a primeira metade da gestação, tanto em peso, altura como diâmetro (BJÖRKMAN, 1954).

Analisando microscopicamente a placenta bovina, observa-se que o epitélio trofoblástico é constituído por dois tipos de células, as células trofoblásticas mononucleadas e as células trofoblásticas gigantes, podendo estas ser binucleadas ou possuírem apenas um núcleo gigante. Ambos tipos celulares estão presentes nas regiões placentomais e interplacentomais, sendo as células binucleadas distribuídas aleatoriamente ao longo do epitélio trofoblástico (WOODING, 1984).

As células trofoblásticas mononucleadas são células cubóides com características típicas de células epiteliais, localizadas na lâmina basal (WOODING et al., 1996), representam aproximadamente 80% da população trofoblástica (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977). No ápice destas células a membrana é formada por processos microvilosos que se interdigitam com processos similares presentes nas células epiteliais uterinas, formando a zona de contato materno-fetal (DENT, 1973).

Estas células mononucleadas estão envolvidas na fagocitose de macromoléculas, especialmente hemácias. A fagocitose de hemácias pelo trofoblasto ocorre quando existe uma área hemófaga no placentônio, que levam as células trofoblásticas a fagocitarem as hemácias maternas extravasadas. Esse mecanismo é denominado eritrofagocitose e ocorre na zona arcada do placentônio, região correspondente à base dos vilos coriônicos e ao topo das criptas uterinas, onde há o contato entre ambos (PEREIRA et al., 2001), vários pesquisadores sugerem que essas áreas hemófagas ou “hematomas” placentários possuem a função de transferir ferro da mãe para o feto (WIMSAT, 1980; MOSSMAN, 1987; PEREIRA, 2004; SANTOS et al., 2006).

As células trofoblásticas gigantes são em sua maioria binucleadas e não apresentam características morfológicas de células epiteliais, constituem aproximadamente entre 15 a 20% da população celular (WOODING, 1982). Estudiosos acreditam que essas células são originárias de células trofoblásticas mononucleadas através de um processo de mitose acitocinética, ou seja, uma sequência de mitoses com duplicação cromossômica e cariocinese (divisão nuclear),

porém sem citocinese (divisão citoplasmática), ou seja, ocorre a duplicação do núcleo, porém o citoplasma não se divide (KLISCH et al., 1999).

As células gigantes binucleadas migram rotineiramente do epitélio trofoblástico e se fundem com células do epitélio materno via formação de pseudópodes, tornando temporariamente células híbridas trinucleadas, chamado sincício (WOODING, 1984), em virtude dessa migração celular, a placenta bovina é caracterizada como sinepiteliocorial, (WOODING et al., 1996; CARVALHO et al., 2006). Após a formação do sincício, as células híbridas entram em processo de degeneração, reabsorção do conteúdo citoplasmático no compartimento materno (LANG et al., 2004). Este mecanismo é necessário para que ocorra o transporte e liberação dos seus grânulos na porção materna, estes grânulos são compostos por hormônios como: lactogênio placentário, estradiol e progesterona (WANGO; WOODING; HEAP, 1990), além de fatores de crescimento associados ao desenvolvimento fetal e manutenção da gestação (SCHAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

Na placenta bovina, classificada como sinepiteliocorial, o sufixo epiteliocorial expressa que o cório do feto está em contato direto com o epitélio do útero, e é caracterizado pela presença de todas as seis camadas de tecidos entre o sangue materno e o fetal, sendo elas: endotélio materno, estroma endometrial, epitélio materno, trofoblasto, mesênquima e endotélio fetal (LEISER; KAUFMANN, 1994; DANTZER, 2002), essas camadas são componentes da membrana inter-hemática, ou seja, da barreira materno fetal.

As placentas são classificadas através de diversos critérios, os quais podem ser de acordo com o tipo de contato, membranas extra-embriônicas, implantação, conexões coriônicas e combinações de tecidos maternos e fetais (BANKS, 1992). Ou ainda segundo Leiser e Kaufmann (1994), conforme o tipo de membrana placentária, formato da placenta, interdigitação materno-fetal e a separação placentária ao nascimento.

De acordo com o número de membranas envolvidas entre a mãe e o embrião, ou seja, o arranjo das membranas fetais, as placentas podem ser classificadas como: coriônica, quando o cório não está em contato com outra membrana (fases iniciais da placentação); corioamniótica, o cório está em contato com o âmnio (mulher e início da placentação de ruminantes e suínos); corioalantóide, o cório está em contato com o alantóide (maioria dos mamíferos) e

coriovitelínica, o cório em contato com o saco vitelínico (cadelas e roedores) (LEISER; KAUFMANN, 1994).

As placentas também podem ser nomeadas quanto ao modelo de interdigitação, no qual é observado como os tecidos maternos e fetais estão distribuídos geometricamente. De acordo com este critério são encontradas placentas pregueada (suínos), labiríntica (roedores), lamelar (carnívoros e primatas) e vilosa (ruminantes, humano). Nos ruminantes o cório forma vilos em forma de árvores que se encaixam perfeitamente ao tecido materno correspondente, as criptas, formadas por tecido endometrial intacto (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Hafez (1954), classificou as placentas dos mamíferos através da distribuição e formação dos vilos coriônicos, segundo o formato da área de junção materno-fetal, descrevendo-as da seguinte forma: placenta difusa, onde os vilos coriônicos estão distribuídos uniformemente sobre toda a superfície do cório (suínos, equino, golfinhos e primatas); placenta zonária (carnívoros) e placenta discoidal (primatas) nas quais as relações materno-fetal se fazem em uma faixa ou disco respectivamente e placenta cotiledonária ou múltipla, na qual os vilos estão restritos a certas áreas, chamadas cotilédones nos ruminantes, como já descrito anteriormente.

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

Mediante os dados abordados sobre as características da placenta e sabendo-se que em todo o período gestacional a placenta passa por um processo de proliferação celular, qualquer comprometimento na formação e desenvolvimento desses tecidos irá prejudicar o sucesso da gestação. Sendo este um dos fatores 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 histológicas em animais clonados/transgênicos.

2.2 Transgenia e clonagem animal

A tecnologia de transgenia tem demonstrado grande importância na área de biotecnologia animal, com a possibilidade de manipulação genética *in vitro* de organismos revolucionou o entendimento sobre processos biológicos e moleculares. A técnica abre a possibilidade de gerar clones transgênicos, com fins terapêuticos, e também de se obter animais mais resistentes. Associada à técnica de transgenia, a clonagem animal pode servir ainda para produzir nos animais transgênicos substâncias que auxiliem no tratamento de doenças em humanos (SANTOS et al., 2006).

Animal transgênico é aquele que tem em seu genoma um material genético originado de outra espécie (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009). Segundo Morris, Diskin e Sreenam (2001), o potencial desta biotécnica permitiria que 10 a 100 vacas produzissem proteínas farmacêuticas suficientes para atender a demanda mundial, com um custo de produção mais satisfatório que a indústria tradicional. A clonagem, associada a animais transgênicos poderá produzir proteínas recombinantes como a lactoferrina e o fator IX, no leite desses animais. Além disso a transgenia poderá ser utilizada para produzir animais para xenotransplantes e ser uma ferramenta em relação as células troncos para transtornos degenerativos adquiridos (MEIRELLES et al., 2008).

Dentre algumas técnicas, a produção de animais transgênicos a partir de células modificadas geneticamente permitiu grandes avanços técnicos na produção de animais transgênicos. O DNA exógeno pode ser incorporado no genoma estudado e a inserção e expressão do transgene ser verificada antes da utilização destas células na produção animal, gerando um produto com as características desejáveis. Uma das grandes vantagens da técnica de transferência nuclear na produção de transgênicos é a possibilidade da manipulação genética das células que servirão como doadoras de núcleo, produzindo animais geneticamente idênticos à célula selecionada (CIBELLI et al., 1998),

Na produção de animais transgênicos, a utilização de células somáticas oferece grande flexibilidade aos pesquisadores. Células somáticas tanto de animais de produção, de laboratório, ou mesmo de animais selvagens e de companhia são facilmente manipuladas e cultivadas *in vitro*, provendo um amplo estoque de material

genético desejado. Esta técnica foi utilizada na clonagem de ovelhas transgênicas e foi mais eficiente do que a de microinjeção. Esse método também permite que pesquisadores estudem o transgene integrado e mantenham as células somáticas geneticamente modificadas congeladas até a clonagem (HOUDEBINE, 2000).

A clonagem de animais é uma técnica que tem contribuído para estudos científicos e tem servido como base para a transgenia, ela proporciona a preservação de raças e espécies em vias de extinção, permitindo a conservação através de bancos genéticos. No melhoramento genético animal a técnica mostra-se muito eficaz para reproduzir animais com características genéticas superiores, além de base para a produção de animais transgênicos (RUMPF, 2007). A primeira clonagem em mamíferos foi a partir da ovelha Dolly com trabalhos de Wilmut et al. (1997), posteriormente diversos trabalhos foram publicados, principalmente após o trabalho de Tomé, Durbarry e Fromentin (2004), que demonstraram não haver risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados de clones bovinos.

Dentre os tipos de clonagem, a clonagem por transferência nuclear é uma das técnicas mais utilizadas. O princípio do processo reúne-se em duas etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada. Os oócitos receptores são normalmente recuperados de ovários de animais abatidos e maturados *in vitro*, ou ainda colhidos de animais vivos por aspiração transvaginal. As células doadoras de núcleos podem ter origem de células embrionárias, fetais e linhas celulares 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, congelados ou para a reclone (GONSALES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2001).

Além das vantagens mencionadas algumas polêmicas relacionadas à técnica de clonagem são amplamente discutidas, ora por ter um custo alto, ora pela inviabilidade na produção de embriões decorrentes das baixas taxas gestacionais e altas perdas embrionárias, sendo observado que apenas 6 a 8% dos fetos apresentam-se viáveis ao nascimento (MIGLINO, 2004). Problemas relacionados às alterações no número, tamanho e formato dos placentônios, presença de hidroalantóide, e de malformações do cordão umbilical são distúrbios normalmente encontrados nestes animais, além de anomalias cromossômicas que é outro fator

relevante (DE SOUZA et al., 2001). Wells (2005), relata que a maioria das perdas gestacionais desses conceitos bovinos clonados ocorrem entre 30 e 60 dias de gestação, é nesse período que ocorre a transição da nutrição fetal vitelínica para a placentária (ASSIS NETO et al., 2009). Gonsales, Figueiredo e Freitas (2001), relataram que estas dificuldades podem estar ligadas à fase de reprogramação celular, que é a fase em que deve iniciar a divisão celular.

Alterações placentárias estão entre as principais causas responsáveis pelas perdas gestacionais de clones bovinos e estão relacionadas à deficiência do desenvolvimento vascular placentário, demora na implantação, formação de número reduzido de placentônios, placentomegalia e consequentemente deficiência na funcionalidade da placenta (BORDIGNON; SMITH, 2008). Miglino (2004), em estudos relatou que falhas no desenvolvimento placentário correspondem aproximadamente 82% de mortes em bovinos clonados entre o 30º e 90º dia de gestação e que poucos neonatos apresentam fenótipo, crescimento e sistema imune funcional.

Essas perdas iniciais no primeiro trimestre gestacional geralmente estão atribuídas à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantoide em decorrência da falta ou ineficiência de vascularização, à rejeição imune e alterações de placentônios (HILL et al., 2000). Além do desenvolvimento deficiente da placenta caracterizado pela presença de poucos placentônios, com número reduzido de aproximadamente 60% do total e cerca de 50% em tamanhos maiores e pela baixa vascularização. Os locais de trocas materno-fetais podem ainda apresentar-se edemaciados com focos hemorrágicos, correlacionando-se diretamente com o comprometimento vascular (MIGLINO, 2004).

Miglino (2004), Bordignon e Smith (2008), sugeriram a existência de três tipos de alterações na placenta de animais clonados produzidos por TN: o subdesenvolvimento do epitélio coriônico da placenta, com evidente decréscimo dos vasos sanguíneos do alantoide, promovendo a morte fetal antes mesmo da formação dos placentônios; a diminuição do número de cotilédones, sem desestruturação do epitélio coriônico, gerando diminuição nas trocas materno-fetal, culminando em morte do feto próximo aos 60 dias de gestação e, por fim, diminuição do número dos cotilédones associado ao aumento do tamanho destes e edema dos envoltórios fetais no terço final da gestação. A redução em número de placentônios e a observação do aumento do diâmetro dos cotilédones indicam a deficiência no

desenvolvimento placentário. Dessa forma pode-se inferir que o aparecimento de cotilédones gigantes seria um mecanismo compensatório para a placentação deficiente no início da gestação (MIGLINO, 2004).

Mediante as vantagens e desvantagens abordadas sobre a técnica de clonagem e transgenia em ruminantes, pesquisas nesta área tem gerado um forte interesse nos setores científicos e produtivos. Contudo, a eficiência da técnica ainda é baixa devido a diversos fatores. Desta maneira, pesquisas ainda necessitam ser realizadas para a compreensão dos diversos eventos envolvidos. Nesta temática a proliferação celular placentária pode estar relacionada na diferenciação do epitélio uterino e trofoblástico, uma vez que tais tecidos sofrem adaptações constantes a fim de acomodar as necessidades do concepto em crescimento, já que o desenvolvimento placentário normal é de extrema importância para a produção de embriões viáveis e conseqüentemente um dos fatores para o nascimento de neonatos saudáveis.

2.3 Proliferação celular

A capacidade de crescer e reproduzir-se são atributos fundamentais de todas as células. No caso das células eucariontes, o processo básico de gênese de novas células, obedecem padrão cíclico que começa com o crescimento celular, determinado por diferentes moléculas que a célula possui, inclusive de seu material genético e culmina com a partição de seu núcleo e citoplasma em duas células-filhas. As células originadas repetem o ciclo e o número de células aumenta exponencialmente. Este processo é denominado ciclo celular. Através dele, o organismo inicia sua existência a partir de uma única célula, o zigoto, que passa por duplicações celulares sucessivas ao longo do período embrionário e permanece ao longo do desenvolvimento do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

O ciclo de vida da célula é dividido em duas fases, a mitose e a intérfase, na fase mitótica ocorre a divisão celular que dá origem a duas células-filhas. A intérfase é a fase que a célula se prepara para a mitose. Cada uma das fases do ciclo leva um tempo para serem concluídas, mas apresenta duração relativamente constante (YOUNG; HEATH, 2001). Ainda que a mitose constitua a etapa espetacular do ciclo celular, é na intérfase que ocorre a duplicação do DNA (ácido desoxirribonucléico).

A intérfase é composta por três períodos consecutivos: G_1 , S e G_2 . A abreviatura G provém do termo inglês GAP (intervalo), em G_1 as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA (ácido ribonucléico) e proteínas, e nela ocorre um marcante aumento do citoplasma das células recém-formadas. O termo S provém do inglês synthesis (síntese), nessa fase a célula duplica seu conteúdo de DNA. O período G_1 representa o intervalo de tempo que transcorre desde o fim da mitose (M) até o início da síntese de DNA (S); o período G_2 é o intervalo entre o término da síntese de DNA e a próxima mitose, após esta etapa inicia-se o processo de mitose, onde ocorrerá a própria divisão celular (LEVINE; PERRY; CHANG, 1994; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Para analisar a atividade proliferativa celular, é necessária a utilização de técnicas imuno-histoquímicas, usando marcadores biológicos aplicados às análises histológicas, que permitem a análise simultânea da proliferação celular e a compreensão das alterações morfofuncionais que ocorrem no processo biológico da célula. A aplicação de marcadores de proliferação celular, através da utilização de antígenos/anticorpos, assegura a quantidade de células em multiplicação, por estarem expressas em vários estágios do ciclo celular, e também a possibilidade de investigação de neoplasias de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (HALL; LEVINSON, 1990).

A utilização de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos, destacando-se neste estudo o uso do PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas) expressos nas células proliferantes, permite a análise simultânea da proliferação celular, com maior destaque na fase S da intérfase (HALL; LEVINSON, 1990; TSUJI et al., 1992; OGAWA et al., 1993). Inúmeros trabalhos relatam a aplicação de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), por ser este marcador, um indicador útil do comportamento biológico de células normais e alguns tumores. Miyachi, Fritzler e Tan (1978), descreveram-na a partir do soro de pacientes com *lupus* eritematoso sistêmico; um antígeno nuclear presente em células proliferativas que inicialmente foi considerado como uma ciclina, em virtude de seu aparecimento cíclico. Posteriormente, Bravo et al. (1987), verificaram que se tratava de uma proteína nuclear ácida de 36 kDa de peso molecular, que funcionava como proteína auxiliar da DNA polimerase delta, associada tanto a replicação do DNA como ao seu reparo (QUEIROZ, 1997). De

Chiara et al. (2013), também relataram que o PCNA pode estar localizado no citoplasma de neutrófilos e auxilia na estrutura morfológica destas células.

A observação do PCNA durante as etapas da intérfase é variável, sendo maior na fase G₁ tardia, atingindo pico máximo em S, diminuindo a partir de G₂ e exibindo baixíssimos níveis em M (início da mitose) (TSUJI et al., 1992; HALL e COATES, 1995; MIGHELL, 1995). De acordo com McMormick e Hall (1992), o PCNA pode não ser específico da fase S ou, necessariamente, estar relacionado com o ciclo celular, podendo estar associado ao reparo do DNA. A expressão do PCNA na célula é considerada positiva quando ocorre a imunorreatividade do tecido, ou seja, quando o núcleo é marcado com coloração amarronzada. Como já mencionado, o PCNA está envolvido na síntese de DNA, pois atua como um dos fatores responsáveis pela sua replicação através de sua ação como co-fator para a DNA polimerase delta (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999).

Com base nos conceitos sobre proliferação e ciclo celular, após a fertilização da célula, o período gestacional pode ser dividido em duas fases, embrionária e fetal, a fase embrionária é o período de diferenciação e começa após a concepção até o processo de organogênese. Durante essa fase ocorre a pré-implantação (do primeiro aos 18º dias em bovinos), a implantação do embrião na mucosa uterina e a placentação, na qual a maioria dos tecidos, órgãos, sistemas e membranas extra-embrionárias são formados (18º aos 42º dias em bovinos) (LEISER; KAUFMANN, 1994; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). A fase fetal inicia-se a partir do 42º dia de prenhez em bovinos, nesse período ocorre um rápido crescimento do conceito junto com o desenvolvimento e aumento de tamanho dos placentônios para acompanhar o crescimento fetal (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000).

O crescimento placentário é um processo que depende de vários fatores, um deles é o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular. Para ocorrer um desenvolvimento adequado o útero precisa exercer influência sobre o crescimento fetal, através do crescimento e maturação dos tecidos carunculares. No início da gestação as carúnculas e cotilédones ainda não estão conectados, portanto não há formação de placentônios, o processo de desenvolvimento inicia-se após o reconhecimento materno da prenhez, sendo finalizado até a organogênese (BERTOLINI et al., 2007). Após esse processo ocorre aumento da massa uterina, que está relacionada com a proliferação e com a hipertrofia celular, nessa fase

observa-se o crescimento acelerado do placentônio, com alto ganho de peso em torno de 100-160 dias de prenhez, posteriormente seu crescimento diminui gradativamente (REYNOLDS et al., 1990).

No último mês de gestação, inicia-se a maturação placentária, caracterizada por mudanças histológicas no placentônio, concentradas no epitélio das criptas maternas, o número dessas células diminui em número e peso, tornam-se achatadas, estabelecendo maior contato com as células trofoblásticas. A maturação do órgão promove maior contato entre as circulações sanguíneas materna e fetal e é pré-requisito para ocorrer o desprendimento e a liberação das membranas maternas e fetais (STALLMACH et al., 2001). Além disso, é observada grande diminuição no número das células trofoblásticas gigantes próximo ao parto (GROSS; WILLIAMS; RUSSEK-COIHEN, 1991).

A apoptose ou morte celular reflete o início desta regeneração tecidual e a contínua nutrição histiotrófica do feto, a qual consiste na fagocitose de células epiteliais maternas apoptóticas. Estes mecanismos são considerados parte do processo de maturação placentária, no qual é pré-requisito para a desconexão materno-fetal e liberação das membranas fetais após o parto. Geralmente a apoptose em células das criptas do epitélio materno e em menor proporção no epitélio do trofoblasto é detectada durante toda a gestação, refletindo a renovação normal, porém no final da gestação ocorre processo inverso onde a apoptose aumenta e a proliferação celular diminui (BOOS; JANSSEN; MULLING, 2003).

Mesmo no adulto, as divisões celulares continuam frequentes. Esse processo de multiplicação, ou proliferação celular, que ocorre por duplicação de células preexistentes, é também o responsável pela reposição de células mortas e pela regeneração de partes danificadas de tecidos ou órgãos. As células morrem não só como resultado de lesões, mas, principalmente por processo fisiológico normal, conhecido como apoptose, tipo de morte celular programada. Por esse meio, o organismo controla e mantém constante o número de células de tecidos e órgãos, livra-se de células danificadas e, ainda elimina células. Sendo assim a manutenção desse mecanismo fisiológico depende do balanço cuidadosamente regulado entre proliferação celular e apoptose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Com o decorrer do período gestacional ocorre a redução da proliferação celular com o aumento da frequência de apoptose, iniciando assim a maturação placentária. A maturação do órgão é um pré-requisito para ocorrer a liberação das

membranas fetais. Sabendo que a proliferação celular desempenha importante papel no crescimento placentário e juntamente com a apoptose, atuam para manter a homeostase do órgão e liberação das membranas fetais, uma disfunção entre ambos pode causar a retenção das membranas fetais, causando problemas reprodutivos na produção de bovinos, portanto é importante o conhecimento desta estrutura aos níveis morfológico e histológico para compreensão de mecanismos que podem levar à falhas gestacionais, já que o crescimento do tecido placentário é importante para o desenvolvimento e diferenciação das estruturas fetais, para fins de se obter neonato saudável.

3 OBJETIVO

Verificar a proliferação celular em placentônios de conceptos bovinos clonados transgênicos, mediante o modelo com expressão da proteína fluorescente verde (GFP), em comparação com conceptos bovinos oriundos de gestação natural aos 60 e 90 dias, mediante imuno-histoquímica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das células com expressão da proteína fluorescente verde (GFP)

O material utilizado foi proveniente da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, SP - USP. As células utilizadas neste experimento foram fibroblastos fetais bovinos macho, da raça Nelore, com 55 dias de gestação e portador de marcador mitocondrial de origem indicus (marcador citoplasmático). As células foram transportadas em cultivo e/ou congeladas em nitrogênio líquido, para a inserção do gene codificador para a GFP nos fibroblastos bovinos.

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). A detecção do antígeno do MHC classe 1b específico de murinos foi realizada usando o anticorpo anti-Qa2 (eBiosciences, cat, # 11-5996).

As amostras utilizadas nesse trabalho foram provenientes do 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, protocolo CEUA 002/2006 – Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” campus experimental de Dracena, SP – Unesp (Pereira et al., 2013).

Para as gestações naturais foram utilizadas amostras de úteros gestantes bovinos de inseminação artificial em abatedouros frigoríficos da região de Dracena e Pirassununga - SP, para controle, 60 (n= 14) e 90 dias (n= 4) de gestação, que tiveram o mesmo procedimento de coleta dos placentônios, que os dos conceptos bovinos transgênicos clonados.

4.2 Técnica de imuno-histoquímica

Para a realização desse trabalho foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica de acordo com a metodologia de Pereira et al. (2013), para a identificação da proliferação celular, no qual o anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, Clone PC10 -Dako Cytomation®) foi utilizado.

As amostras de placentônios das gestações naturais e as dos conceptos bovinos transgênicos clonados, foram incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 4 μ m; posteriormente foram colocadas sobre lâminas silanizadas e em seguida incubadas em estufa a 60°C. Após esse período, as secções de placentônios foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de etanol. O desmascaramento antigênico foi realizado pelo aquecimento dos cortes em tampão citrato (0,384g de ácido cítrico mono-hidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico di-hidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) por 15 minutos em forno microondas. A atividade de peroxidase tecidual endógena foi bloqueada pela incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos ao abrigo da luz. Logo após os cortes foram lavados com solução de tampão fosfato PBS (16,61g de fosfato de sódio dibásico anidro; 2,20g de fosfato de sódio monobásico monohidratado; 8,50g de cloreto de sódio; 1L de água destilada, pH 7,4 – sendo 100 mL dessa solução diluída em 900mL de água destilada) e as lâminas foram secas e incubadas com o anticorpo primário na concentração de 1:250 diluídos com tampão PBS e solução de BSA (albumina sérica bovina 3,5%). As lâminas foram incubadas em câmara úmida “overnight” a temperatura de 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS, depois incubadas com o anticorpo secundário Biotinalled Link - Dako® K0690, por 60 minutos em câmara úmida a 4°C e lavadas novamente com PBS. Posteriormente foram incubadas com Streptavidin-HRP Dako® K0690 nas mesmas recomendações do anticorpo secundário acima. A reação foi revelada com kit DAB (Diaminobenzidina - DAB-buffer substrate; DAB-chromogen, Dako® K3468) e para finalizar, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e as lâminas permanentes foram montadas para análise sob microscopia de luz, que possibilitou a visualização da marcação positiva amarronzada dos núcleos das células em proliferação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se à comparação da marcação da proliferação celular, além da observação das características histológicas em placentônios de bovinos clonados transgênicos e de gestações naturais, ambos com 60 e 90 dias de gestação.

Ao analisar as características histológicas das estruturas envolvidas na interação materno-fetal, verificou-se que elas possuem a mesma composição celular, com epitélio uterino simples cúbico, estroma endometrial desenvolvido e células trofoblásticas mononucleadas e células trofoblásticas gigantes binucleadas, com núcleos arredondados e nucléolos evidentes (Figuras 1-5).

Tais elementos celulares, somados ao mesênquima e aos vasos sanguíneos constituem a junção materno-fetal, como descrito por (PINTO et al., 2008). Winsatt (1980) e Bosch (2006), descreveram que células trofoblásticas mononucleadas possuem aspecto arredondado com núcleos evidentes de diferentes tamanhos que evoluem para células trofoblásticas gigantes binucleadas. Estes resultados colaboram com Cazerta et al. (2007); Pinto et al. (2008); Oliveira et al. (2010), que em estudos com bovinos no início da gestação, observaram epitélio uterino cúbico e células trofoblásticas gigantes uninucleadas e binucleadas com núcleos arredondados com nucléolos bem evidentes, sendo estes achados também observados neste estudo. Em placentas de búfalas Pereira et al. (2001) e Benetone (2005), também verificaram a presença de células trofoblásticas gigantes binucleadas.

As células trofoblásticas gigantes mononucleadas e binucleadas foram encontradas nas amostras deste trabalho, e estavam presentes nos compartimentos materno e fetal (Figuras 1-5), como relatados por Wooding (1982; 1992); Leiser e Kaufmann (1994); Klisch et al. (1999); Carvalho (2000); Macintyre et al. (2002); Lang et. al (2004); Prestes e Alvarenga (2006), também verificaram a presença de células trofoblásticas gigantes binucleadas em bovinos e ovinos, caracterizados pela migração e posterior fusão das células binucleadas fetais com a células cuboidais do epitélio uterino, formando as células tri ou multinucleadas no compartimento materno.

Para as reações de PCNA, em ambos os grupos e idades gestacionais, a marcação positiva foi encontrada no epitélio fetal, nas células trofoblásticas gigantes binucleadas, nas células endoteliais e com menor intensidade no estroma endometrial. Nos animais de gestação natural aos 60 dias, verificou-se no presente estudo que a principal reação positiva foi detectada nos epitélios fetal e uterino, e em menor intensidade no tecido conjuntivo fetal (mesênquima) e uterino (estroma endometrial) (Figuras 1a,c; 2a,c). Já nos conceitos clonados aos 60 dias de idade (Figura 3a,c) a marcação foi observada com maior evidência no epitélio fetal.

Boos e Stelljes (2000), em trabalhos com placentônios bovinos também observaram menor marcação no estroma endometrial, relatando que a capacidade proliferativa das células do estroma parece ser relativamente baixa, fato este também observado no presente estudo.

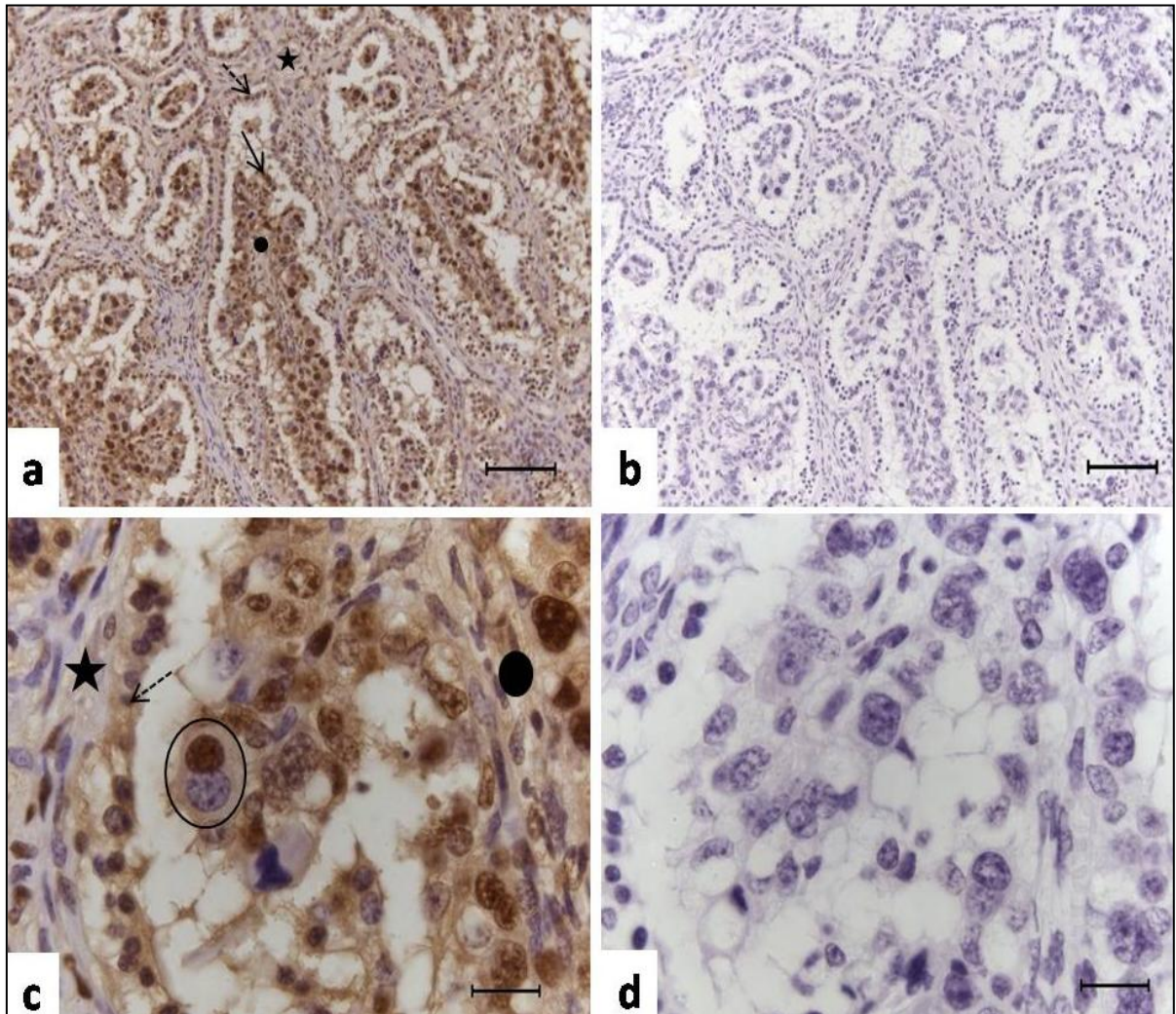


Figura 1 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 60 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal e uterino. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em maior aumento da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada circundada (destaque) com imunorreatividade específica, pois apenas um núcleo estava reativo ao anticorpo. d) Controle negativo de b. a,b: barra=100µm; c,d: barra=20µm. Seta cheia, epitélio fetal; seta interrompida, epitélio uterino; (•) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial). Fonte: Dados da pesquisa do autor.

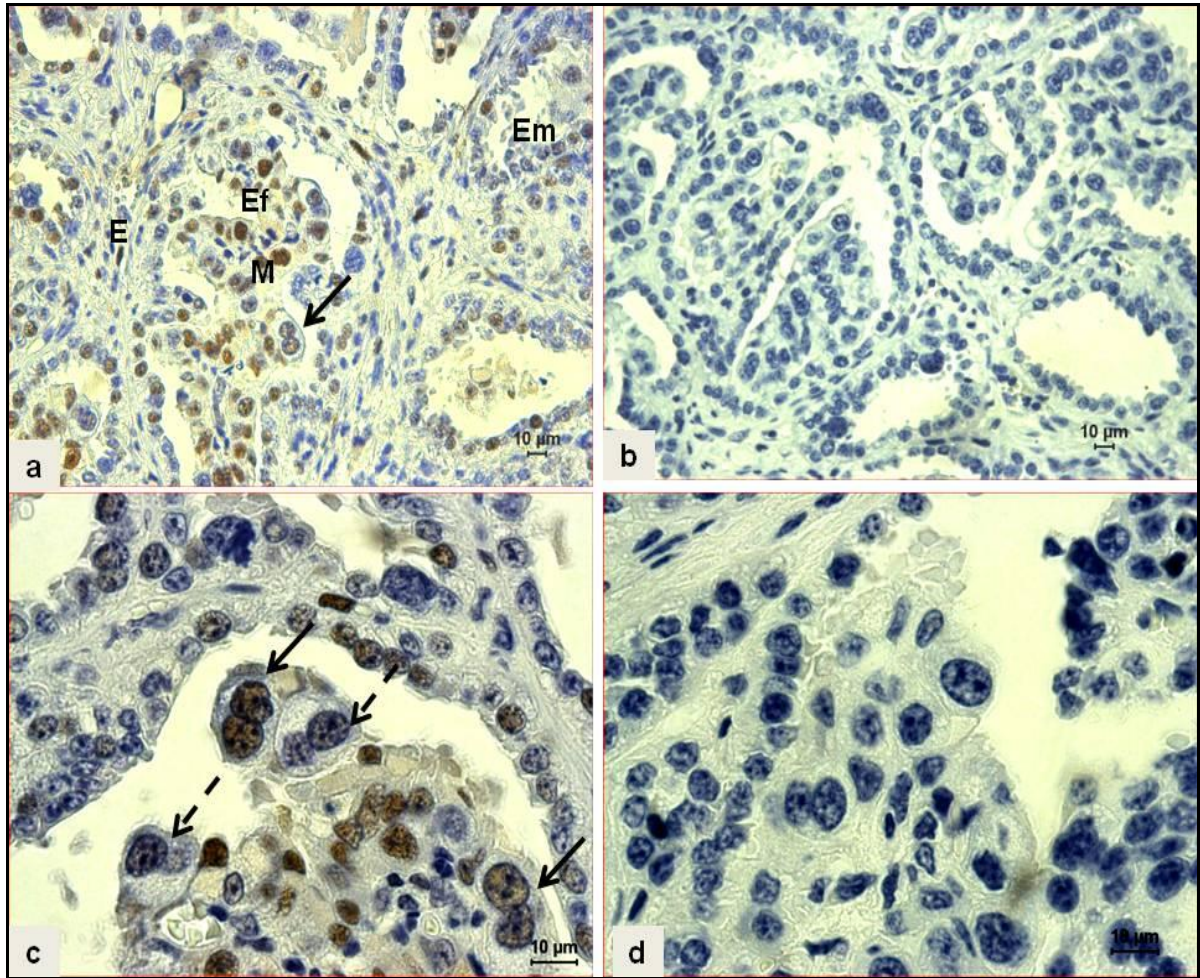


Figura 2 – Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 60 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal e uterino, com maior evidência no epitélio fetal. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em aumento 100x da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada com imunorreatividade nos dois núcleos. d) Controle negativo de c. Célula binucleada com apenas um núcleo reativo (seta interrompida); célula binucleada reativa (seta cheia); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em). Fonte: Dados da pesquisa do autor.

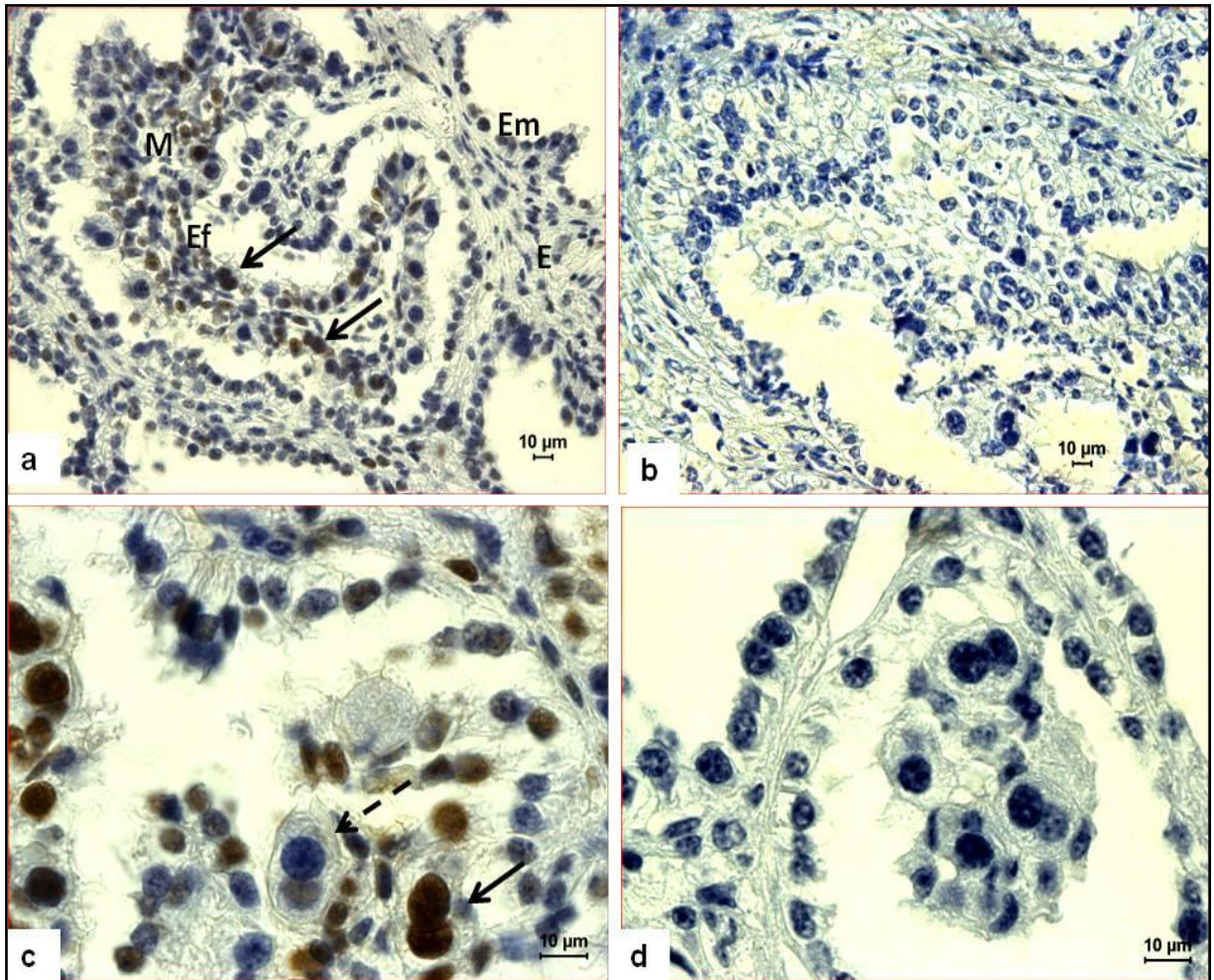


Figura 3 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA); placentônios bovinos de conceitos clonados transgênicos, 60 dias de gestação. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal, e, como nos animais de gestação natural, observamos também a marcação específica do anticorpo, no qual apenas um núcleo da célula binucleada estava reativo (seta interrompida). b) Controle negativo de a. c) Célula binucleada reativa representada pela seta cheia; célula binucleada com apenas um núcleo reativo (seta interrompida); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em); M (mesênquima). Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Ao observar as células trofoblásticas gigantes binucleadas foi verificada marcação positiva para PCNA nestas células, sendo que algumas apresentaram um núcleo marcado e o outro não (Figura 1c, 2c e 3c, 5a), e outras com os dois núcleos marcados (Figuras 2a,c; 3a,c; 4a; 5a,b). A marcação específica de apenas um núcleo das células trofoblásticas gigantes binucleadas pode ser explicada pelo fato do núcleo marcado estar na fase S do ciclo celular e o núcleo negativo estar na fase G₂ do ciclo, ou também estes núcleos estarem em estágio imaturos de multiplicação do genoma. Este achado corrobora com os dados de (WINSATT, 1980; TSUJI et al., 1992; HALL; COATES, 1995; KLISCH et al., 1999, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Faciootti et al. (2009), ao estudar placentônios bovinos de 60-120 dias de gestação observaram um número menor de células na fase G₂/M, e um número maior de células G₀/G₁. Estes dados também foram encontrados por Rici et al. (2011), em bovinos com gestação de 60 a 120 dias. Presumidamente, as células que tiveram seus dois núcleos marcados podem estar na mesma fase de processo proliferativo, ou seja, na intérfase na fase S e, conseqüentemente, estarem no mesmo estágio de maturação nuclear.

Em análise imuno-histoquímica com o antígeno de proliferação celular Ki-67 (Dakocytomation/USA-Clone/Klon MIB-1®) em placentas bovinas, Schuler et al. (2000), também observaram marcação positiva do PCNA nas células mononucleadas e nas células trofoblásticas gigantes binucleadas em bovinos. Rici et al. (2011), observaram que as células trofoblásticas gigantes binucleadas apresentaram uma maior marcação em relação às células mononucleadas. Estes dados foram encontrados em nosso estudo e corrobora com os achados de Trerè, (2000), no qual relata que nas células trofoblásticas gigantes binucleadas ocorre uma proliferação mais acentuada.

Analizando a marcação de proliferação em placentas bovinas Boss, Jansen e Muling (2003), verificaram que tanto o epitélio fetal quanto o materno apresentaram um maior índice de proliferação celular comparado ao estroma. Yamauchi et al. (2003), em trabalhos com bovinos oriundos de inseminação artificial e de conceitos clonados aos 30-60 dias, observaram marcação positiva no estroma endometrial e verificaram que atividade proliferativa das células do estroma na região caruncular (CAR) é maior que na região intercaruncular. Segundo Björkman (1969), células em proliferação indicam sua participação na nutrição do conceito e fatores responsáveis pela indução desta rápida proliferação da CAR que talvez

derivem do conceito, já que a proliferação celular não ocorre em úteros não gestantes de vacas.

Artoni (2005), também observou marcação positiva no epitélio fetal, epitélio materno, estroma endometrial e no mesênquima fetal em búfalas de idade gestacional de 70-115 dias, em marcações para proliferação celular com o anticorpo anti Ki-67 (Biosource, Estados Unidos, monoclonal, clone MB67®). Estes dados condizem com os resultados encontrados por Benetone (2005), em estudos com placentônios de búfalas provenientes de diferentes períodos gestacionais, encontrou marcação positiva das células epiteliais das criptas uterinas e do epitélio fetal, nos primeiros terços gestacionais e verificou que a marcação diminui com o decorrer da gestação.

Rici et al. (2009), em estudos com bovinos de gestação natural e conceptos clonados no terço inicial da gestação, observaram que os animais manipulados em laboratório tinham uma maior atividade proliferativa e uma taxa reduzida de apoptose na região central dos placentônios e áreas interplacentomais quando comparado aos animais de gestação natural. Tais fenômenos podem estar associados à placentação deficiente no início da gestação, insuficiência placentária ou até mesmo falta de maturação placentária no final da gestação, eventos que são comuns em manipulações *in vitro* de embriões como a clonagem por transferência nuclear.

Na idade gestacional natural aos 90 dias, a reação positiva do PCNA foi detectada no epitélio fetal, e pouca marcação no tecido conjuntivo fetal (mesênquima) (Figura 4a,c). Esta menor intensidade de marcação pode ser devido ao equilíbrio entre proliferação e apoptose celular, pois a medida que o feto se desenvolve a proliferação diminui e a apoptose aumenta (BOSS; JANSSEN; MULLING, 2003). Porém nos placentônios bovinos de conceptos clonados transgênicos aos 90 dias de gestação foi observado que a imunorreatividade foi intensa no epitélio e tecido conjuntivo fetal (mesênquima) (Figura 5a,b), em relação à gestação natural, onde a marcação foi pouco evidente no mesênquima, este resultado pode demonstrar uma possível falha nos mecanismos de proliferação celular. Tal período gestacional em condições normais de desenvolvimento placentário é característico pelo início da redução da atividade proliferativa celular nos tecidos placentários/fetais. Bertolini et al. (2007), relata que para ocorrer um crescimento placentário adequado é necessário um conjunto de fatores, sendo um

deles o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada (apoptose) de acordo com cada período gestacional.

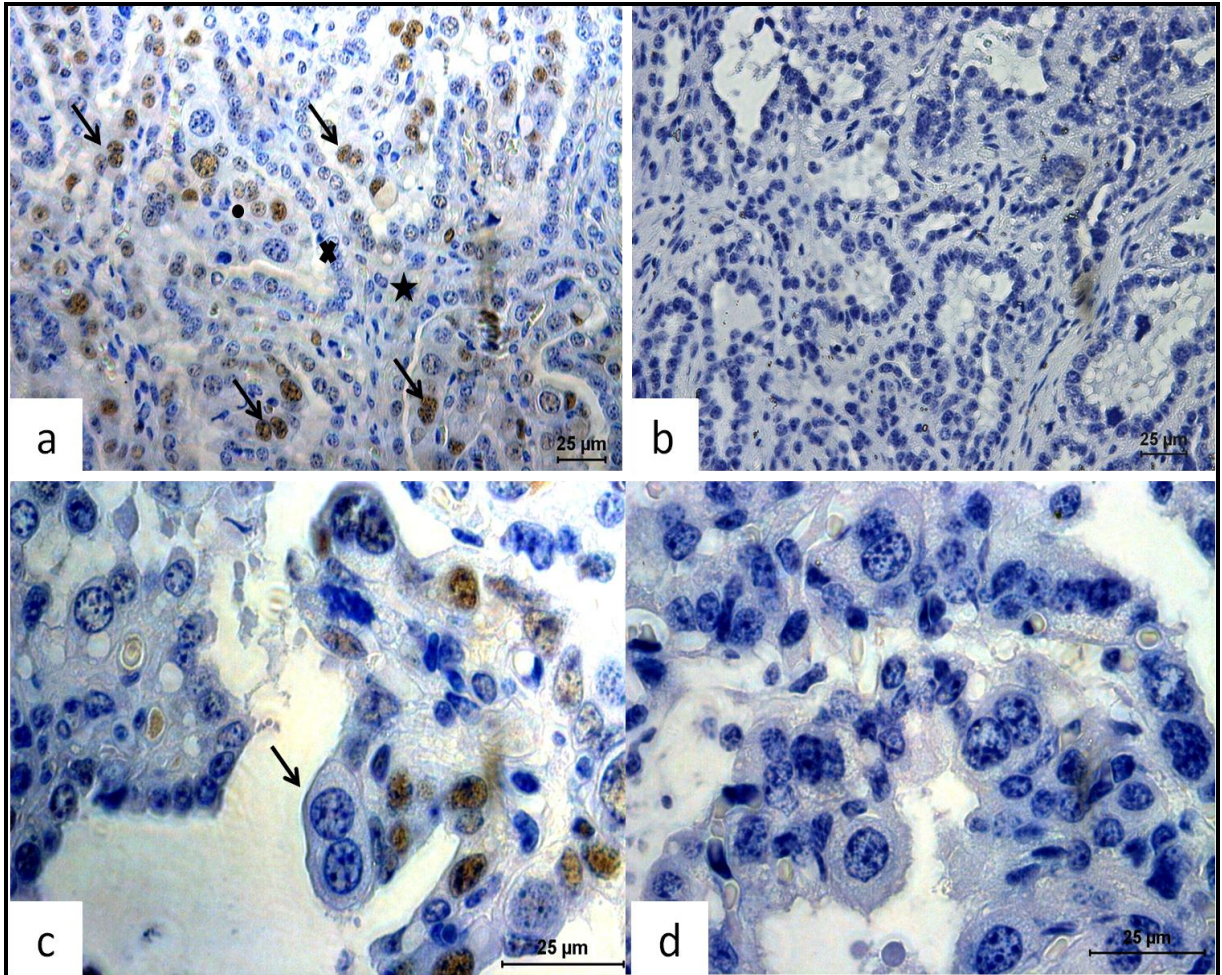


Figura 4 – Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 90 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em aumento 100x da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada, seta cheia. d) Controle negativo de c. Seta indicando o epitélio fetal; (x) epitélio materno, (•) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial). Fonte: Dados da pesquisa do autor.

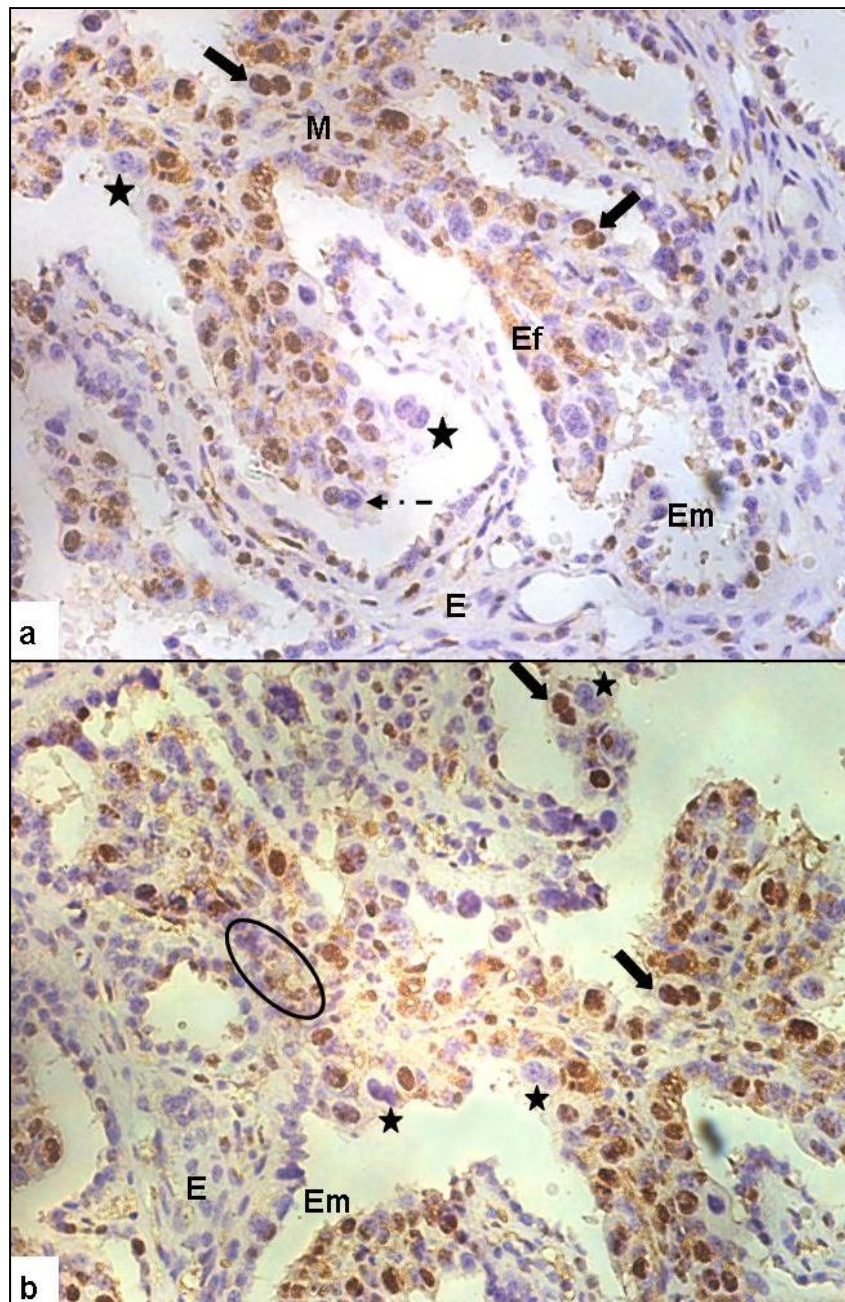


Figura 5 - Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA); placentônios bovinos de conceitos clonados transgênicos, 90 dias de gestação. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal, e, como nos animais de gestação natural, observamos também a marcação específica do anticorpo, no qual apenas um núcleo da célula binucleada estava reativo (seta interrompida). b) Nesta fotomicrografia de luz podemos observar a interação materno-fetal (elipse). Célula binucleada não-reativa (★); célula binucleada reativa (seta cheia); mesênquima (M); epitélio fetal (Ef); estroma endometrial (E); epitélio materno (Em). Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Ao visualizar as células gigantes trofoblásticas binucleadas e/ou multinucleadas dos conceptos clonados transgênicos aos 90 dias, observou-se que parte destas células migraram para o epitélio uterino, com a formação de “aspecto sincicial” (falso sincício) (Figura 5b). Na Figura 5b (elipse), por exemplo, uma parte da interação materno-fetal manteve-se íntegra, não estando separada. Neste local, coincidentemente, formou-se o chamado “falso sincício trofoblástico”, justamente devido à placentação bovina ser do tipo sinepiteliocorial, em que células trofoblásticas gigantes binucleadas migram do epitélio fetal para o epitélio uterino, fusionando-se ou não com estas últimas, formando células tri ou multinucleadas. Pereira (2004); Carvalho et al. (2006), também relatam que pode ocorrer a fusão de algumas células epiteliais uterinas mediante essa movimentação, e formar um evento característico da placenta de bovinos que a classifica como sinepiteliocorial. Essa migração pode ser interpretada como uma invasão trofoblástica “restrita” ao epitélio uterino, não ultrapassando os limites da membrana basal (NAKANO et al., 2001; PFARRER; KLISCH; LEISER, 2003).

O aumento visível da marcação de proliferação celular mais aos 90 dias de gestação, nos leva a inferir um possível desequilíbrio nos padrões de proliferação celular nos conceptos bovinos clonados transgênicos, pois no início da gestação aos (60 dias) apresentaram uma menor atividade proliferativa e no outro período (90 dias de gestação) visivelmente um aumento; este fato demonstrou que gestações manipuladas em laboratório podem ser atípicas em relação aos parâmetros normais que se espera de uma gestação natural. Sendo assim, tais gestações podem ser menos eficientes para a viabilidade do embrião em termos de eficiência placentária, levando a menor área de troca de substâncias materno-fetais. Desse modo os resultados de verificação da proliferação celular e seu entendimento são importantes requisitos para a compreensão de possíveis falhas no desenvolvimento gestacional em técnicas avançadas de manipulação embrionárias, como a produção de animais transgênicos e a clonagem animal.

Os ensaios de proliferação celular e a regulação do desenvolvimento embrionário/fetal pela apoptose, continuarão sendo estudados por nosso grupo, a fim de obtermos respostas de nível molecular, podendo contribuir com o desenvolvimento da área de neonatologia de ruminantes, além de podermos contribuir também para estudos sobre proliferação de células tumorais, pois já foi demonstrado no trabalho de Pereira et al. (2013) que a placenta sinepiteliocorial

bovina apresenta uma interação materno-fetal íntima, semelhante a outros tipos de placenta, como por exemplo a de roedores, que são consideradas modelos eficientes de placentação.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados observados, a atividade proliferativa foi menor nos animais clonados transgênicos aos 60 dias e, houve um aumento aos 90 dias de gestação, havendo assim um desbalanço em relação às gestações naturais. Portanto concluiu-se que existem diferenças entre os padrões de proliferação celular entre os bovinos de conceitos transgênicos clonados e provenientes de IA. Sendo estes resultados de grande importância para futuras pesquisas na área de biotecnologia animal, podendo ser um dos fatores que não permitem que a clonagem seja utilizada com sucesso em alta escala.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 193-196.
- ARTONI, L.P. **FGF e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Anatomia em Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- 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.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992. p. 121-125.
- 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
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R.; GERGER, R.P.C.; BATCHELDER, C.A.; ANDERSON, G.B. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.391-405, 2007.
- BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Record**, v.163, p.17-30, 1969.
- BJÖRKMAN, N. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta Anatomica**, v.22, p.1-91, 1954.
- BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem animal por transferência nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO JR; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 3.ed. São Paulo: Rocca, 2008. p.347-364.
- BOSHIER, D.P.; HOLLONAY. The sheep trophoblast and placental function: na ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v.124, p.287-298, 1977.
- BOSH, R.V. **Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BOSS, A.; JANSSEN, J.; MULLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomas during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as

well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v.126, p.469-480, 2003.

BOOS, A.; 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.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P.A.; MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary proyein of polimerase-d. **Nature**, v. 326, n. 6112, p. 515-7, 1987.

CARVALHO, A. F. **Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalus bubalis bubalis*) - Linnaeus, 1758**. 2000. 110f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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.

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

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

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

DANTZER, V. **Endometrium of epitheliochorial and endotheliochorial placentae**. London: Taylor & Francis, 2002. p.352-364.

DE CHIARA, A.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; MOCEK, J.; CANDALH, C.; MAYEUX, P.; MILLET, A.; WITKO-SARSAT, V. Characterization of cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, 2013.

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

DE 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, n. 1, p.23-30, 2001.

FACCIOTTI, P.R.; RICI, R.E.G; 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. **Reproductive Biology Endocrinology**, v.7, n.25, 2009.

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

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

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Ed. Manole, 2004. p. 403-415.

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

HALL, P.A.; COATES, P.J. Assessment of cell proliferation in pathology-what next? **Histopathology**, v. 26, n.2, p.105-112, 1995.

HALL, P. A.; LEVINSON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **Journal of Clinical Pathology**, v.43, n. 2, p.184-192, 1990.

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

HOUDEBINE, L. M. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Research**, v. 9, p. 305-320, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 209-217.

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.

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.

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

LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; CHANG, A. The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 29, n.3, p.409-416, 1994.

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, p.1430-1436, 2002.

McMORMICK, D.; HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, v. 21, n. 6, p.591-604, 1992.

MEIRELLES, F.V.; PROVIDELO, F.D.; PERECIN, F.; MERIGHE, G.K.F.; FERREIRA, C.R.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; MIRANDA, M.S.; CHIARATTI, M.R.; de BEM, T.H.C. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.382-390, 2007.

MIGHELL, A. PCNA and p53. **European Journal Cancer Part B: Oral Oncology**, v.31, p.403-404, 1995.

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

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.; PEREIRA, F.T.V.; VISINTIN, J.A.; 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, 2007.

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.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **Journal Immunology**, v.121, n.6, p. 2228-2234, 1978.

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

MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. Carnegie Inst. Washington Publ. 479. **Contributions to Embryology**, v.26, p.129-246, 1937.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate Fetal Membranes**. v.1. New Brunswick: Rutgers Press, 1987. p. 283-289.

NAKANO, H.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. **Cell and Tissue Research**, v. 303, n. 2, p. 263-270, 2001.

OGAWA, I.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T.; VUHAHULA, E.; IJUHN, N.; NIKAI, H. Proliferating activity of salivary gland pleomorphic adenomas and myoepitheliomas as evaluated by the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index (LI). **Journal Oral Pathology & Medicine**, v.22, p. 447-450, 1993.

OLIVEIRA, C.M. **Aspectos anatômicos e histológicos da placenta de zebuínos criados na Amazônia Oriental**. 2007. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 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 Brasileira**, 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.

PEREIRA, A.F.; FREITAS, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.118-128, 2009.

PEREIRA, F.T.V. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis* Simpson, 1945)**. 2004. 102f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

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.; WEISE, S.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; LEISES, R.; HOFFMANN, B.; SCHULER, G. Fibroblast growth factor (FGF) -1, FGF2, FGF7 and FGF receptors are uniformly expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. **Placenta**, v.27, p.758-770, 2006.

PINTO, L.M.; AMBRÓSIO, C.E.; TEIXEIRA, D.G.; ARAÚJO, K.P.C.; KFOURY JÚNIOR, J.R.; MORINI JÚNIOR, 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**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.110-121, 2008.

PRESTES, N. C.; ALVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia Veterinária**. Ed. série Roberto Calderon Gonçalves, Luiz Carlos Vulcano. Rio de Janeiro: Koogan, 2006. p. 192-194.

QUEIROZ, L.M.G. **Expressão do PCNA, Ki-67, c-erbB-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar.** 1997. 78f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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

REYNOLDS, L. P.; MILLWAY, 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.

RICI, R.E.G.; FACCIOTTI, P.R.; AMBRÓSIO, C.E.; MARIA, D.A.; KFOURY, J.R.; BERTOLINI, M.; MIGLINO, M.A. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 29-38, 2009.

RICI, R.E.G.; FACCIOTTI, P.R.; MARIA, D.A.; FERNANDES, V.M.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A. Evaluation of the contribution of the placentomal fusion during gestation in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 126, p.143-150, 2011.

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

SANTOS, R. B.; BELETTI, M. E. Ultraestrutura de placenta bovina durante todo o período gestacional. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.18, n. 2, p.149-154, 2012.

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.

SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; FAILING, K.; HOFFMANN, B. Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 49 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. **Reproduction Domestic Animal**, v. 24, p. 46-51, 2000.

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

TOMÉ, D.; DUBARRY, M.; FROMENTIN, G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. **Cloning Stem Cell**, v.6, p. 172-177, 2004.

TRERÉ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 27-131, 2000.

TSUJI, T.; SHRESTHA, P.; TAKAGI, H.; SHINOZAKI, F.; SASAKI, K.; MAEDA, K.; MORI, M. Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: an immunohistochemical study. **Virchows Archiv. A, Pathology Anatomy and Histology**, v.420, n.5, p.377-383, 1992.

YAMAUCHI, N.; TAKEZAWA, T.; KIZAKI, K.; HERATH, C.B.; HASHIZUME, K. Proliferative potencial of endometrial stromal cells, and endometrial and placental expression of cyclin in the Bovine. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, n.6, p. 553-560, 2003.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Weather – Histologia functional**: texto e atlas em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. cap 9. p. 97-110.

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.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; TIPO, A.J.; CAMPBELL, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810-813, 1997.

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.

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.

