

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
DE COTILÉDONES FETAIS OVINOS ORIUNDOS DE EMBRIÕES
TRANSFERIDOS COLETADOS NO MOMENTO DO PARTO

JOSIANE ADELAIDE CAMARGO LOURENÇÃO

BOTUCATU-SP
SETEMBRO – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
DE COTILÉDONES FETAIS OVINOS ORIUNDOS DE EMBRIÕES
TRANSFERIDOS COLETADOS NO MOMENTO DO PARTO

JOSIANE ADELAIDE CAMARGO LOURENÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
(Área de concentração: Reprodução
Animal), como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Adjunto Nereu Carlos Prestes
COORIENTADORA: Prof^a. Adjunta Noeme Sousa Rocha

BOTUCATU-SP
SETEMBRO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lourenção, Josiane Adelaide Camargo.
Análise histopatológica, morfométrica e
imunohistoquímica de cotilédones fetais ovinos oriundos de
embriões transferidos coletados no momento do parto /
Josiane Adelaide Camargo Lourenção. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia
Orientador: Nereu Carlos Prestes
Coorientador: Noeme Sousa Rocha
Capes: 50504002

1. Ovino. 2. Placenta. 3. Transferência de embriões.
4. Receptores hormonais.

Palavras-chave: Células binucleadas; Epitélio coriônico;
Placenta; Receptores hormonais; Vascularização.

Nome da autora: Josiane Adelaide Camargo Lourenção

Título: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE COTILÉDONES FETAIS OVINOS ORIUNDOS DE
EMBRIÕES TRANSFERIDOS COLETADOS NO MOMENTO DO PARTO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Nereu Carlos Prestes

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Ass. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva

Membro

Departamento de Patologia Humana – Faculdade de Medicina de Botucatu

FMB – UNESP – Botucatu

Prof^o Titular Francisco Eduardo Martinez

Membro

Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências

IB- UNESP – Botucatu

Data da defesa: 30/09/2016

DEDICATÓRIA

A minha avó Lúcia Manoel Lourenção (in memoriam), ao meu pai José Geraldo Lourenção (in memoriam), aos meus tios, Márcia, Ana, Paulo, Japão, que estiveram presentes em todos os momentos, pelos ensinamentos e pela formação do meu carácter, dedico. Dedico também aos meus primos, Camila e Murilo, pela amizade e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, me iluminar, e por me manter firme durante os períodos difíceis.

Aos meus tios: Tia Ana, Tia Márcia, Tio Japão, Tio Paulo e Tia Cláudia, pelo incentivo, carinho e paciência, tenho enorme gratidão por me ensinarem e mostrarem o caminho. Vocês são acima de tudo meus pais que me acolheram e me incentivaram quando nem eu acreditei que poderia chegar até aqui!

Ao meu orientador, professor Nereu Carlos Prestes, por me acolher e dar a oportunidade de voltar a estudar. Obrigada pelo carinho e ensinamentos, é uma honra ser sua filha do coração. Muito obrigada!

A minha coorientadora, professora Noeme Sousa Rocha do Departamento de Patologia Veterinária, obrigada pela amizade e carinho. Sua ajuda e conselhos foram fundamentais nesse período.

Aos meus primos Camila, Murilo, Isabela, Beatriz e Gustavo, pelo incentivo, vocês são especiais e devo-lhes todo amor.

Ao meu irmão Fernando Felipe Lourenção, minha cunhada Mirian Gruppi, pela paciência e carinho durante esse período.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelos ensinamentos e incentivo.

À prof. Dra. Eunice Oba pela oportunidade de entrar no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal nessa instituição de ensino.

À prof. Dra. Fabiana Ferreira de Sousa pelos ensinamentos e correções deste trabalho.

À prof. Dra. Maria Denise Lopes, pelo carinho, ajuda e por ceder alíquota do anticorpo de progesterona.

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez do Departamento de Anatomia, por ceder gentilmente o uso do Laboratório de Histologia para que eu pudesse processar o material para o histopatológico.

À prof. Dra. Renée Laufer Amorin, por ceder o uso do laboratório de imunohistoquímica, bem como os materiais para o procedimento.

Ao prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela análise estatística.

Aos vínculos de amizade que pude construir nessa universidade, em especial: Ana Pagnano Derussi (Guta), pelo incentivo, risadas e conselhos. Isadora F. Costa, pela ajuda e amizade, Luciana Smith pelas conversas e rotinas de imuno.

A minha amiga e irmã do coração Nathália Genú Nakazato, sua amizade foi fundamental nesse período, obrigada por tudo!

A Carla Queiroz (Carlinha), pela amizade que construímos ao longo desses dois anos.

Ao meu amigo e irmão Matheus José Prestes pelo incentivo, risadas e carinho, meu irmão de coração, agradeço imensamente.

A minha amiga Géssica Meneghin mesmo que distante mantivemos uma amizade sincera, obrigada.

Aos colegas do laboratório (REPAS), pelas risadas e momentos de descontração.

Ao funcionário do laboratório de técnicas histológicas do departamento de anatomia Gelson Rodrigues, por ajudar a processar as amostras, e pela amizade de oito anos desde o período da minha iniciação científica.

Ao técnico do departamento de Patologia, pelos serviços histotécnicos prestados durante todo esse período.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, por serem prestativos.

A Fábio Ximenes e Sr. Genuíno Bordignon, obrigada pela estadia na fazenda e por permitirem colher o material necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida, permitindo dedicação exclusiva e execução do projeto.

A minha pequena Filó, pelo amor incondicional e carinho.

A todos aqueles que não pude citar por esquecimento, e que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis grupo e medida, TE (1) e controle (2) .	32
Tabela 2. Mediana do número total de células trofoblásticas binucleadas contadas por campo e células imunomarcadas para receptores ER- α , ER- β e PR entre os grupos TE (1) e controle (2).....	45
Tabela 3. Distribuição das células imunomarcadas para PR, ER- β e ER α em células trofoblásticas binucleadas segundo a distribuição de frequências das categorias de coloração e grupo.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração do útero contendo feto humano observando-se no detalhe (seta) e nos esquemas adicionais estruturas de morfologia semelhante ao placentoma de ruminantes (O'MALLEY E SAUNDERS, 2012).	18
Figura 2– Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) Artéria coriônica com lesão perivascular (seta), esclerose (*), capilar com infiltrado inflamatório (cabeça de seta). (B) Veia com adesão de fibrina, trombo e infiltrado inflamatório e lesão (seta). (C e D). Observar artéria e veia coriônica com espessamento endotelial (barra). (E) Veia com hialinização endotelial (cabeça de seta). (F) Veia coriônica rompida e aderência de fibrina e hemossiderina (asterisco), capilar com infiltrado inflamatório (cabeça de seta). (G) Vilosidades terminais com capilares uniformemente distribuídos. (H) Veias coriônicas com presença de trombo. HE – 200X.	33
Figura 3 - Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (Controle) – (A-B) artéria coriônica sem espessamento endotelial (barra), 200X (C) artérias, veias coriônicas de vilosidade primária, (D) vilosidades com capilares com distribuição uniforme, HE – 100X.....	35
Figura 4 – Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) ressalta-se o epitélio trofoblástico com pigmentos castanhos dourados (hemossiderina), HE, (B) Reação positiva de Perls (pigmento azul), (C) epitélio trofoblástico com característica hiperplásica (barra). (D) Reação PAS positiva na base do epitélio (cabeça de seta), célula trofoblástica na região do epitélio (seta). (E) epitélio trofoblástico com projeções citoplasmáticas apicais (seta), (F) característica hipoplásica do epitélio (barra), HE – 400X.....	37
Figura 5 - Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) observar epitélio com CTBs em fase de degeneração (a-b-c-d), CTBs com características íntegras (cabeça de seta) - HE. (B- C) célula trofoblástica binucleada em condensação (seta), (D) Célula com presença de micronúcleo (cabeça de seta) azul de toluidina – historesina 400X e 630X	39
Figura 6 – Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (controle) – (A) epitélio com cristais de hemossiderina, (B) CTBs com núcleo íntegro (seta) - HE. (C) epitélio trofoblástico com projeções citoplasmáticas apicais (cabeça de seta), CTB (seta) (630X), (D) reação positiva para Perls (pigmentos azuis), 400X e 630X. (E) Reação PAS positiva, base do epitélio coriônico (cabeça de seta), célula trinucleada no epitélio coriônico (seta), HE - 400X, (E) variações na altura do epitélio (barra), 400X.....	41
Figura 7- Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) presença de hemorragia no espaço intervilo (*), tecido conjuntivo (cório) na coloração em azul – T. masson - 200X, (B) presença de fosfato de cálcio na região do cório – Von Kossa – 100X, (C) presença de fosfato de cálcio na região do cório – HE – 100X (D) presença de hemorragia no espaço intervilo (*) grupo controle – T. masson 200X, (E) presença de fosfato de cálcio na região do cório, grupo controle (grânulo negro) – V. kossa – 100X.....	43
Figura 8— Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino TE e controle – (A) CTBs imunomarcadas por PR grupo TE (seta), (B) imunomaração positiva para PR nas CTBs (seta), grupo controle. (C) Ausência de imunorreatividade grupo TE, CTBs com ausência de ER- α (cabeça de seta). (D) Presença de ER- α grupo controle, CTBs com imunorreatividade positiva (seta). (E) Fraca imunorretividade para ER β , grupo TE, observar CTBs com fraca imunomarcção (cabeça de seta), (F) Imunoexpressão positiva para ER- β grupo controle, imunorreacção presente nas CTBs (seta), 400X.	46

DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

α – alfa

β – beta

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

CTBs – Células trofoblásticas binucleadas

CYP11A – citocromo P450

DHEA - 16 α - deidropiandosterona

ERs – estrogen receptor

3 β -HSD - 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

CEUA – comissão de ética de uso de animais

CL – Corpo lúteo

HE – hematoxilina eosina

HPA – eixo hipofisário adrenal

IFN-t – interferon tau

LH – Hormônio luteinizante

> - maior

< - menor

$\pm$ - mais ou menos

® - marca registrada

μ m – micrometros

mg – miligramas

mL- mililitros

mM – milimolar

nº - número

PAS – ácido periódico de Shiff

PBS – phosphate buffered saline

PCR – reação em cadeia polimerase

P4- progesterona

P5 - pregnolona

PGE – prostaglandina

PGF₂α – Prostagaldina 2 alfa

PR – progesterone receptor

PR-A – progesterone receptor A

PR – B - progesterone receptor B

pH – potencial hidrogeniônico

% - porcentagem

Kg – quilograma

TRIS – Trizma Base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Desenvolvimento e morfologia da placenta epiteliocorial	19
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivos gerais	27
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL	28
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	28
4.3. MORFOMETRIA DOS COTILÉDONES FETAIS.....	29
4.4. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA (ER- α), BETA (ER- β) E PROGESTERONA (PR)	29
4.5. Análise estatística	31
5. RESULTADOS	31
5.1. Histopatologia.....	31
5.2. Análise morfométrica dos cotilédones fetais	32
5.3. <i>Imunohistoquímica para ER-α, ER-β e PR</i>	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	51
8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
9. ARTIGO.....	66

LOURENÇÃO, J. A. C. Análise histopatológica, morfométrica e imunohistoquímica de cotilédones fetais ovinos oriundos de embriões transferidos coletados no momento do parto. Botucatu, 2016. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Devido a sua facilidade de manejo, a espécie ovina é um modelo experimental para estudos nas áreas de cirurgia, obstetrícia e reprodução animal. A prática da transferência de embrião vem sendo aperfeiçoada visando a seleção de animais geneticamente superiores. A estrutura placentária permite trocas gasosas, metabólicas e transporte de nutrientes, tornando-se responsável pelo desenvolvimento fetal. O presente estudo teve como objetivo relacionar a técnica de TE às alterações morfológicas e analisar receptores de estrógeno alfa (ER- α), beta (ER- β) e progesterona (PR). Foram utilizados 20 animais, os quais foram divididos em dois grupos, 10 (TE) e 10 (controle). Foram colhidos 4 cotilédones de cada animal e o material foi fixado em formalina tamponada com pH 7,4 para inclusão em Paraplast® e glutaraldeído para historesina. As amostras foram seccionadas a 4 μ m e coradas em HE, que após análise prévia foram encaminhadas para coloração específica, PAS, tricômico de masson, von kossa e Perl. Para a análise morfométrica utilizou-se três amostras de cada animal de ambos os grupos, analisados da base ao ápice da microvilosidade no aumento de 400X em 10 campos. Para o estudo de receptores, seis cotilédones de seis animais de ambos os grupos foram selecionados, analisados e contados por três observadores em 10 campos por amostra. No presente estudo observou-se trombo arterial e venoso, esclerose, aderência de fibrina, espessamento endotelial, hialinização de vasos e infiltrados inflamatórios, tais alterações foram evidentes nas árvores vilosas primárias do grupo TE. Na região do epitélio cotiledonário, encontrou-se acúmulo de hemossiderina, células trofoblásticas binucleadas (CTBs), micronúcleo, condensação citoplasmática e nuclear nas CTBs, e projeções citoplasmáticas apicais. Ainda no epitélio observou-se presença de fosfato de cálcio, os quais também foram identificados na região do cório, também no espaço intervilloso foi observado sangue extravasado. Essas características foram encontradas em ambos os grupos. Entretanto, na análise morfométrica houve diferença estatística entre as medidas M2 e M3 ($p < 0,05$), porém entre os grupos não houve diferença estatística. Para os receptores estudados, apenas o ER- α mostrou-se ausente em todo epitélio trofoblástico no grupo TE; já no grupo controle a imunoreatividade foi fraca nas CTBs, porém positiva ($p < 0,001$). O ER- β e PR foram imunoexpressos em ambos os grupos, os quais não mostraram diferença estatística. Também constatou-se decréscimo das CTBs no grupo TE, porém essa característica foi observada independente dos receptores estudados ($p = 0,013$). Podemos concluir que as alterações vasculares, bem como os infiltrados inflamatórios, são sugestivas de placentite, e as alterações encontradas no epitélio são condizentes à maturidade e expulsão da placenta no momento do parto. A diferença entre ER- α e ER- β possivelmente estão relacionadas aos mecanismos fisiológicos no momento do parto, e a ausência de ER- α supostamente está associada aos receptores de PR, sugerindo uma regulação hormonal negativa.

Palavras-chaves: placenta, epitélio coriônico, vascularização, células binucleadas, receptores hormonais e ovelhas.

LOURENÇÃO, J. A. C histopathology, immunohistochemistry and morphometric fetal cotyledons sheep coming from transferred embryos collected at moment of the birth. Botucatu, 2016, 97p. Dissertation (Masters) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Due to its easy management, the ovine species are na experimental model for studies in areas such as surgery, obstetrics and animal reproduction. The embryo transfer practice has be perfected saiming the selecton of genetically superior animals. The placental structures enables gas exchanges, metabolic exchanges and transporto of nutrientes, becoming responsible for the fetal development. The objective of this study was to relat the ET technique to the morphological changes, and to analyze estrogen alpha (ER- α), beta (ER- β) and progesterone (PR) receptors. 20 animals divided in two groups, 10 (ET) and 10 (control), were used 4 cotyledons from each animal were collected and the material was fixed in buffered formaline with pH 7,4 for inclusion in Paraplast[®] and glutaraldehyde for historesin. The samples were sectioned in 4 μ m and stained with HE, which after previous analyses were forwarded to specific staning, PAS, masson's trichrome, von kossa and Perl. For the mophometric analyses, three samples of each animal form both groups were used, they were analysed from base to the apex of the microvillous at the magnification of 400X ib 10 fields. For the receptors study, six cotyledons of six animals from both groups were used, they analyzed and counted in 10 fields per sample by three observers. In this study, arterial and venous thrombus, sclerrosis, fibrina adhesion, endotelial thickening, hyalinizing vessels and inflammatory infiltrades, were observed, such alterations were apparent in primary villous trees from ET group. In cotyledondary epithelium region, accumulation of hemosiderin, binucleate trophoblastic cells (BTC), micronucleus, cytoplasmatic and nuclear presence of calcium phosphate was observed in the epithelium and wich was also indentified in the corium region, and spilled blood was observed in the intervillous space. Those characteristics were found in both groups. However, there were statical diferences between the measurements M2 and M3 ($p < 0,05$) in the morphometric analysis, although there was no statistical difference between the groups. For the receptor studied, only ER- α was absent from the trophoblastic epithelium in the ET group; in the control group, the immunoreactivity was weak in the BTC, although positive ($p < 0,001$). ER- α and PR were immunoexpressed in both groups, wich did no show statistical difference. A decrease of BTC was detected in the ET group, this characteristic was observed regardless of the receptors studied ($p = 0,013$). We can conclude that vascular alterations, as well as inflammatory infiltrades, suggest placentitis, and the alterations found in the epithelium are consistente with maturity and expulsion of the placenta at moment of the birth. The difference between ER- α and ER- β is possibly related to physiological mechanisms at the moment of parturition, and absence of ER- α is supposedly associated to PR receptors, suggesting down-regulation.

Keywords: placenta, chorionic epithelium, vascularization, binucleate cells, hormonal receptors and sheep.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino apresenta um potencial de reprodução e produção no Brasil. São animais de pequeno porte que possuem facilidade de manejo e totalizam 17.614.454 cabeças no país (IBGE, 2014). O ovino é modelo experimental aplicável em estudos nas áreas da cirurgia, reprodução animal e obstetrícia humana dentre outras.

A placenta é um órgão importante para o metabolismo e desenvolvimento fetal, capaz de transportar nutrientes, permitir realização de trocas gasosas, produzir hormônios coma a finalidade de manter a gestação. Sendo um órgão transitório fundamental na gestação, suas características são amplamente estudadas devido a sua variação morfológica entre as espécies.

Devido a sua importância a placenta foi representada por Leonardo Da Vinci no ano de 1510. No desenho é possível observar estruturas que se assemelham a placenta de ruminantes. Andreas Vesalius em *De Humani Corporis Fabrica*, em sua ilustração caracterizou uma placenta do tipo zonária envolvendo um feto humano. O termo placenta foi denominada por Colombo (Realdus Colombus), anatomista de 1559, derivado do latim “bolo achatado”, cujo desenho mostrava uma estrutura em forma de disco, similar ao exibido por Spiglius em *Formato Foetus* (1626). Erasmo Darwin, avô de Charles Darwin, naturalista e evolucionista, fez analogia da placenta com arcabouço similar ao pulmão e brânquias de peixes, referindo-se à vascularização do tecido, comparando como uma árvore necessitando de suas raízes e tronco vascularizado comparado um cordão umbilical, com uma anatomia similar.

Em 1927, Grosser classificou pela primeira vez os diferentes tipos de placentas de acordo com a barreira inter-hemática, recebendo a denominação de epiteliocorial, sindesmocorial, endoteliocorial e hemocorial. Dez anos mais tarde, Mossman (1937), definiu a placenta como órgão justaposto aos tecidos maternos e fetais tendo como objetivo o intercambio fisiológico, entre ambos.

A principal característica da placenta é a justaposição ao endométrio uterino, contendo duas camadas teciduais funcionando como uma barreira seletiva principalmente aos fatores imunológicos e facilitando a expulsão dos envoltórios após o parto. O período gestacional da ovelha é de 140 a 153 dias, e sua placenta é caracterizada como epiteliocorial, possuindo células trofoblásticas binucleadas que são capazes de migrar do epitélio caruncular ao epitélio cotiledonário. Os tufo vilosos estão conectados ao endométrio constituindo os placentomas ou placentônios, tendo formatos de esferas côncavas, sendo extremamente vascularizados, e sua função dependente do fluxo

sanguíneo materno e fetal (SCHOENAU, et al, 2005). Portanto, a placenta é um órgão temporário capaz de produzir hormônios dentre outros elementos, tais como o lactogênio.

O presente estudo propõe-se verificar possíveis alterações estruturais e receptores hormonais através da imunohistoquímica, explorando a biotecnologia de transferência de embriões (TE) em ovinos.



Figura 1 Ilustração do útero contendo feto humano observando-se no detalhe (seta) e nos esquemas adicionais estruturas de morfologia semelhante ao placentoma de ruminantes (O'MALLEY E SAUNDERS, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento e morfologia da placenta epiteliocorial

Em ruminantes a placentação é adeciuada com morfologia epiteliocorial, diferente da placenta humana que são decíduadas e hemocoriais, e o trofoblasto está justaposto aos vasos sanguíneos maternos ou é diretamente banhado por sangue materno (MURPHY et al, 2007; CARTER et al, 2013; CARTER, 2009). Existe uma grande diversidade estrutural entre as placentas de mamíferos. A placenta de pequenos ruminantes é descrita como epiteliocorial e cotiledonária. É caracterizada pela remoção do epitélio uterino e tecidos conectivos maternos em contato com o cório, dando espaço para o epitélio microviloso, constituindo o cotilédone ou tufo viloso (WOODING E BURTON, 2008; ROA et al, 2012; LACERDA, 2006).

Após a fertilização, o embrião passa por estágios sucessivos de divisão celular, modelagem e compactação, caracterizando a mórula, composta por blastômeros. No estágio de blástula ocorre a formação do blastocele, envolta por uma massa de células que compõem o trofoderma (SCHLAFFER et al, 2000). A implantação em ruminantes é superficial e a placentação e inicia-se por volta do 15º e 16º dia, contudo observou-se que entre 50-60 dias, não está totalmente completada (WIMSAT, 1950). Esta fase em ruminantes subdivide-se em três: a pré-fixação caracterizada pelo embrião de forma alongada; a aposição – quando há contato celular entre o trofoblasto e o endométrio; e a adesão – onde as estruturas celulares darão origem a placenta epiteliocorial (GUILLEMOT E GUAY, 1982).

No momento em que ocorre a implantação do embrião no endométrio, o epitélio uterino colunar é gradualmente substituído por células multinucleadas ou placas sinciciais nas áreas carunculares da placenta, e esta dinâmica celular foi observada em ovelhas e cabras (WOODING, 1982; WOODING, 1984; WANGO et al, 1990). O contato do trofoderma ao lúmen endometrial inicialmente é instável, porém aos 14 dias pós implantação o feto alongado se estabiliza no lúmen uterino. Esta aposição está acompanhada pela redução da microvilosidade apical, revestindo o trofoderma, ocorrendo entre os dias 13 e 15 da gestação (GUILLOMOT E GUAY, 1982). No décimo sexto dia, o trofoblasto começa a aderir ao lúmen endometrial, resultando na interdigitação do trofoderma, o qual ocorre nas regiões intracarunculares do endométrio (HRADECKY et al, 1988; APLIN E HEY, 1995). Em cabras a implantação tem início no 14º e 17º dia gestacional, e nesse período é possível observar mudanças morfológicas

no epitélio uterino. Nessa etapa o embrião ocupa 15% do corno uterino, ficando evidente o epitélio colunar pseudoestratificado (GAVIRIA E HERNANDEZ, 1994). Observa-se grande número de divisões celulares no sincício, que se originam da fusão de células epiteliais uterinas no momento da implantação (WOODING et al., 1980).

O placentoma é formado por unidades ou tufos vilosos (cotilédones) e projeções endometriais (carúncula). Sua distribuição e posição anatômica possibilita as trocas metabólicas na circulação materno-fetal, e tem como função, respiração, nutrição e excreção (MAJEED et al, 2011; SUZANA et al., 2007; WOODING, 1990). As carúnculas endometriais são estruturas especializadas aglandulares que se comunicam com o cório-alantóide (WOODING., 2006). Em ovelhas, os cotilédones são côncavos, com árvores vilosas cilíndricas e longas e estão separados por áreas intercotiledonárias de cório liso. Os vilos coriônicos são delgados e originando ramificações primárias, secundárias e terciárias (LEISER E KAUFMANN, 1994; PEREIRA et al, 2001; CAZERTA et al, 2007).

Os cotilédones estão arranjados em quatro fileiras, duas de cada lado da implantação do pedículo umbilical do hilo placentário e são múltiplos, encontrando-se distribuídos por toda superfície placentária durante o primeiro trimestre gestacional (CROSS, 2003; PEREIRA et al, 2001; ENDERS E CARTER., 2004). Os placentomas crescem em número e tamanho aos 80 dias gestacionais e apresentam vilosidades coriônicas separadas dentro de criptas, constituindo um mesênquima vascular com grande massa de célula que originam células trofoblásticas mononucleares e células trofoblásticas binucleadas (CTBs) (MAJEED et al, 2011).

Almeida et al (2000), constataram que a vascularização da placenta é distribuída de forma irregular não obedecendo nenhum padrão, havendo centenas de arranjos de artérias e veias tanto em gestações únicas quanto múltiplas. As artérias e veias do funículo umbilical se direcionam para cada corno uterino gravídico, possuindo um trajeto mais curto, remetendo ramos aos cotilédones (SCHOENAU et al, 2005). O cotilédone é irrigado através de um tronco arterial principal o qual direciona-se a vilosidade primária, e as artérias carunculares e veias se originam da artéria uterina da região endometrial do placentoma (KREBS et al, 1997)

As células mononucleares compõem 80% do epitélio, revestindo o epitélio das árvores vilosas, estando distribuídas ao redor das CTBs e não possuem conexão com a

membrana basal ou junções microvilosas. (WANGO E WOODING, 1990). Essas células são encontradas em ovinos, caprinos, cervídeos e bovinos (WOODING, 1992).

Também foi constatado que essas células permanecem inicialmente distribuídas entre os dias 13 a 14 pós cobertura, logo abaixo da lâmina trofoderma na posição intra-epitelial e abaixo da junção apical (WOODING, 1984). Outras características encontradas por Ward et al, 2002, mostraram que os núcleos são ovais e possuem grânulos na borda externa do citoplasma. Essa característica também foi relatada em cabras (WOODING, et al, 1990). São capazes de produzir ou sintetizar hormônios, como o hormônio lactogênio placentário, glicoproteínas dado à presença do retículo endoplasmático rugoso (MORGAN et al, 1990; WOODING, 1992).

A principal característica das CTBs é a capacidade de migração do epitélio caruncular, que está adjacente a zona apical do trofoderma para as junções ocludentes, ocorrendo fusão das células uterinas formando células derivadas de tecidos híbridos fetomaternais que se desenvolvem na face materna (WOODING, 1992; WOODING et al, 1980). Em bovinos as CTBs foram encontradas com dois ou mais núcleos, entre o 60º e 120º dias de gestação e são abundantes, localizando-se próximas à zona ocludente materno fetal (PINTO; et al). Estão em menor quantidade e são encontradas nas áreas cotiledonárias e intercotiledonárias do placentoma, além de ampla capacidade de sintetização de hormônios (WOODING E WATHES, 1990; WOODING, 1992; MORGAN et al, 1990).

BJÖRKMAN (1968) identificou diferenças entre as células binucleadas de acordo com sua disposição no epitélio. Dessa forma, foram denominadas CTBs, e células gigantes das criptas. As CTBs apresentam características de degeneração celular, porém, as células gigantes da cripta são relativamente maiores que as trofoblásticas, já as CTBs são de tamanhos variáveis, e estão localizados em vários níveis do epitélio.

Em ovinos as CTBs surgem a partir do 17º dia de gestação. Em estudos ultraestruturais constatou-se que 15-20% das CTBs migram nas zonas juncionais entre o cório e epitélio uterino até o momento do parto, havendo um decréscimo no final da gestação. As CTBs surgem no epitélio coriônico entre 37 e 260 dias gestacionais e sua principal característica é a capacidade de migração do epitélio caruncular, e são encontradas adjacentes a zona apical do trofoderma para as junções ocludentes. (BOSHIER E HOLLOWAY, 1977; WOODING E WATHES, 1990). Porém, em placentas bovinas há redução CTBs no tecido fetal colhido depois de 1 hora do momento pós-parto (GROSS et al, 1991).

De acordo com os tipos de placenta entre os animais, a passagem de substâncias ocorre através da barreira inter-hemática. A absorção do ferro na forma de transferrina, em sua primeira etapa, dá-se na superfície externa do trofoblasto em contato direto com a circulação materno-fetal. Este mecanismo está presente em placentas hemocoriais, no qual a implantação do embrião é invasiva (ROA et al, 2012). Em ruminantes a absorção advém de eritrócitos através do epitélio coriônico que se encontra em contato direto com concentração de sangue extravasado. Portanto, está presente em placentas epiteliocoriais. Já em placentas difusas, a absorção de ferro ocorre por meio do epitélio coriônico (OLIVEIRA et al, 2012). O tamanho da placenta está diretamente ligado a capacidade de fornecer nutrientes, fazer trocas metabólicas e gasosas. A capacidade de trocas gasosas e nutrientes entre a mãe e o feto é suscetível a estímulos ambientais e adapta-se para o fornecimento de nutrientes (FOWDEN et al, 2006).

A placenta possui mecanismos de difusão passiva, facilitada e transporte ativo, com receptores de membranas específicos na superfície dos vilos, e, portanto, facilitando a absorção de ferro. O tecido placentário possui um fluxo sanguíneo útero-placentário, um mecanismo importante para disponibilizar os nutrientes, (BROLIO et al, 2011). Em ruminantes antes da diferenciação do trofoblasto, a nutrição é histiotrófica, e está diretamente conectado a capilares maternos e secreções glândulares. O mecanismo histiotrófico presente em ruminantes, é rico em enzimas, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, glicose, proteínas de transporte e íons de ferro (GRAY, 2001; CARTER e ENDERS, 2004).

A nutrição histiotrófica é derivada de glândulas uterinas sendo absorvida na aréola placentária e são estruturas específicas em suínos e ruminantes, o qual se desenvolvem para absorção e transporte de nutrientes (SPENCER E BAZER, 2004). Em humanos durante a fase inicial da gestação o fluido no espaço interviloso são originadas de glândulas uterinas, e nessa fase em grande parte a nutrição é histiotrófica. A medida que se aproxima o último trimestre gestacional, formam-se conexões entre o espaço interviloso e as artérias espiraladas, havendo filtração do plasma por meio do citotrofoblasto (BURTON E JANAIUX, 2001).

O contato do trofoblasto fetal e decídua do útero permite que os nutrientes cheguem ao feto (BROLIO et al, 2011). Em placentas hemocoriais, as vilosidades coriônicas são banhadas diretamente por sangue materno. A vilosidade capilar é separada do sangue materno por três camadas celulares: o capilar endotelial celular, o tecido conectivo intersticial e o citotrofoblasto (GOYER, 1990). Na transição evolutiva na

placentação epiteliocorial, há retenção do epitélio uterino, significando um aumento inicial na distância de difusão para oxigênio, em comparação com estruturas placentárias mais invasivas (CARTER, 2009).

A presença de eritrócitos em grandes quantidades na placenta vem esclarecendo sua morfofisiologia e distribuição de ferro em ruminantes. Os placentomas de búfalas estudados no período de quatro a seis meses de gestação, mostraram a presença de hematomas ou áreas hemófagas, as quais são caracterizadas pelo acúmulo de sangue materno extravasado no interstício entre os epitélios uterino e trofoblástico. O processo de absorção de ferro em ovelhas e cabras ocorre pelo extravasamento de sangue com a conexão materno-fetal e fagocitose imediata dos eritrócitos pelo trofoblasto e esse mecanismo é similar em bovinos (OLIVEIRA et al, 2012). A eritrofagocitose é evidente em placentas epiteliocoriais. Em cotilédones fetais seccionadas de forma sagital, foi possível observar eritrofagocitose no epitélio da zona arcada. O epitélio compõe o microvilo e possui numerosas células, vacúolos com eritrócitos volumosos e fragmentados com pigmentos de hemossiderina (SANTOS et al, 1996).

Em búfalas em diferentes dias de prenhez, as áreas hemófagas mostraram-se inúmeras ao longo da conexão materno-fetal, com quantidade variável de sangue extravasado. No estudo também notaram a presença de áreas adjacentes de hematomas e eritrofagossomas, sugerindo a eritrofagocitose (PEREIRA et al, 2001). Já em bovinos clonados foi possível observar extensas áreas de sangue extravasado na região abaixo do placentoma. Em sua histologia o sangue extravasado ocorre debaixo do alantocório edematoso e essa alteração também foi visível nas áreas interplacentomais (MIGLINO et al, 2007).

No desenvolvimento fetal é necessária extensa distribuição de íons de ferro, e seu transporte é unidirecional, ocorrendo somente da mãe para o feto (CAZERTA et al., 2007) O ferro é um íon importante durante o desenvolvimento, possui alta concentração na circulação fetal, indicando uma maior afinidade no transporte da placenta para o feto e está presente na mãe. (GAMBLING et al, 2001). É importante saber que a funcionalidade da placenta depende da circulação materna e fetal, podendo variar entre as espécies (ENDERS E CARTER, 2004; SCHOENAU, et al, 2005).

2.2.Esteroidogênese e síntese de progesterona (P4) e estrógenos (ER- α e ER- β) na placenta

A progesterona e o estrógeno estão presentes nas placentas de muitos mamíferos. São derivados de esteroides e exercem funções importantes durante a gestação, regulando o ciclo reprodutivo e as características sexuais secundárias, e também estão presentes na placenta (CUNNINGHAM E KLEIN, 2007).

O reconhecimento materno e desenvolvimento do feto depende de secreções que se originam do epitélio uterino (SPENCER et al, 1999). Aos 20 e 30 dias após o estro o mecanismo luteolítico é reativo, entretanto, aos 50 dias é suspenso e a placenta assume a produção de progesterona (P4) (BAZER et al, 1998). Durante a gestação a placenta de ovinos produz o lactogênio placentário (PL) e hormônio do crescimento (GH), sugerindo que há influência na esteroidogênese do corpo lúteo (CL), proliferação endometrial para o desenvolvimento da placenta e expressão gênica de receptores de progesterona (PR). (ANTHONY et al, 1995; HANDWERGER et al, 1977).

Os hormônios esteroides sexuais são convertidos a partir da pregnolona (P5) na mitocôndria. A biossíntese já está presente no momento da clivagem, na qual a P5 é convertida P4, androgênos e estrógeno (CUNNINGHAM E KLEIN, 2007). Os hormônios esteroides são derivados do colesterol, do 17 β -estradiol, do estrona, do estriol e da progesterona. O P450 aromatase converte o colesterol em P5, que se dispersa fora da mitocôndria. O colesterol é convertido em pregnolona na membrana mitocondrial pelo citocromo P450 (CYP11A). A P450 aromatase presente no retículo endoplasmático rugoso, se encarrega pela catalisação dos estrógenos. As moléculas de oxigênio sofrem redução com NADPH (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), e no fígado o estradiol é convertido em estriol (PASQUALINI, 2005).

Durante a gestação o estriol é sintetizado no sinciotrofoblasto, e convertido em sulfato 16 α -deidroepiandrosterona ou DHEA (GRUBER et al, 2002). O DHEA é convertido pela enzima 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteróide desidrogenase), que se origina das glândulas supra-renais fetal, subsequentemente é convertida em estrógeno (MILLER, 1998; TUCKEY, 2005; LABRIE et al, 2001).

A placenta é capaz de converter a P5 em P4 pela enzima 3 β -HSD, entretanto, em placentas humanas não há essa conversão. Isso ocorre devido à ausência do citocromo P450. Porém, utiliza-se substratos andrógenos a partir da glândula adrenal fetal e materna para a sintetização. Entretanto a expressão gênica obtido a partir de PCR em tempo real

(reação em cadeia da polimerase) do 3 β -HSD mostrou-se positiva nas CTBs em placentas bovinas (VANSELOW et al, 2008).

Em algumas espécies animais, como em equinos, a produção de progesterona após a fertilização ocorre através dos cálices endometriais, e posteriormente a este período a placenta assume a sua produção (ALLEN E STEWART, 2001). Em bovinos, as CTBs cultivadas em substrato de P5 mostraram ampla capacidade de conversão para P4 (WOODING, 1996). Entretanto, em pequenos roedores, a produção de P4 situa-se na base da zona do labirinto no terço final da gestação, confirmando a hipótese que a diferença estrutural entre as placentas animais influenciam na conversão, síntese e produção de hormônios esteroides (MATT, 1985).

A P4 é indispensável para o útero se manter em repouso, evitando o parto prematuro. Em células carunculares vasculares a imunorreatividade foi positiva para PR, isso ocorre devido à proximidade da célula com o local de produção de P4, o qual é controlada pelo CL. Em células binucleadas a produção de P4 parece não estar relacionada com a P4 lútea, sugerindo que a P4 tem atuação parácrina na placenta (SCHULER et al, 1999).

Na espécie ovina a produção de P4 através da placenta ocorre a partir do 17º dia de gestação, concomitante a presença das células binucleadas e ocorre em várias fases da prenhez, do 50º ao 70º e 90º aos 120º (RICKETTS e FLINT, 1980). Experimentos *in vitro*, com cotilédones aos 50 dias gestacionais incubadas com (hormônio luteinizante) LH, demonstraram que o tecido tem ampla capacidade de converter a pregnolona em progesterona. O LH pode servir como substrato esteroideogênico, sendo que a produção de progesterona nos dias supracitados é suficiente para manutenção da gestação (KOLIGIAN E STORMSHAK, 1976). A síntese de P4 foi mais notória em ovinos e pouco evidentes em caprinos (WANGO et al., 1991; WANGO et al, 1992).

Em bovinos clonados e não clonados não houve diferença de imunomarcagem entretanto as células analisadas (binucleadas e trinucleadas) mostraram-se evidentes para PR (FERNANDES et al, 2012). Também houve forte imunorreatividade para PR no labirinto placentário em placentas de roedores (TELLERIA et al., 1999). Por outro lado, há duas diferentes isoformas de PR e são encontradas em placentas humanas no momento do parto responsáveis pela contratilidade endometrial, são elas: PR-A e PR-B (ARNETT-MANSFIELD et al, 2001; WANGO et al, 1992).

Na maioria dos mamíferos a P4 tende a decrescer no momento do parto, porém, em primatas humanos e não humanos não há queda (SHANKER E RAO, 1999). Em

placentas bovinas, há transferência direta de P4 no estroma caruncular, o qual migra para as células binucleadas (REIMERS et al, 1985). A PR foi localizada nas paredes arteriais, sugerindo uma regulação da P4 na segunda metade da gestação, concomitante aumento da regulação da esteroidogênese placentária, ocasionando a elevação de estrógenos no momento de pré parto (SCHULER et al, 1999). A principal via para a síntese de estrógeno é a 17- α -hidroxilase, que ocorre a partir da conversão da androstenediona em P4. No momento desta conversão há quase um completo bloqueio da 17- α -hidroxilase. Em placentas bovinas a principal fonte de P4 é o corpo lúteo (CL), ou seja, a placenta não assume total produção de P4 (HOFFMANN E SCHULER, 2002).

O estrógeno tem a função no desenvolvimento dos órgãos genitais femininos, tecidos neuroendócrinos e glândula mamária. Seus receptores estão divididos em dois subtipos - estrógeno alfa (ER- α), estrógeno beta (ER- β), (LEVIN, 2001; LEUNG et al, 2006). As isoformas ER- α e β , também são responsáveis pela proliferação celular, e estão relacionadas principalmente com neoplasias mamárias, síndrome do ovário policístico e carcinomas endometriais (HARDMAN et al, 2003; MYERS et al, 2004).

O ER- β possuem funções que incluem ação celular proliferativa, regulação dos mecanismos apoptóticos e resposta de imunomodulação (KOEHLER et al, 2005). Em muitos aspectos, o ER- β está ligado a propriedade de funcionamento de órgãos vitais (PELLETIER E EL-ALFY, 2000). A ação do ER- α ainda é desconhecida, porém há presença desse receptor em tecidos como encéfalo e trato reprodutor masculino e feminino (REVANKAR et al, 2005). Entretanto, o ER- α é mais limitado, e está em alta concentração no ovário, no trato reprodutor masculino e no hipotálamo (DIEL, 2002; COUSE et al, 1999). ER- α e ER- β são receptores nucleares, isto não inclui apenas receptores hormonais, mas também estão presentes em certas vitaminas e em hormônios tireoidianos (COWLEY E PARKER, 1999).

Em ruminantes, o interferon-tau (IFN-t) e estradiol são responsáveis pela ação anti-luteolítica do CL para o reconhecimento materno. O INF-t bloqueia a expressão de receptores de ER- α , evitando assim, a estimulação do estrógeno e de receptores de ocitocina (BAZER et al, 2008; SPENCER E BAZER, 2004; SPENCER et al, 1995). Aos 10 e 21 dias de gestação o IFN-t é secretado em alta quantidade pelo embrião, evitando assim um aumento de ER- α e receptores de ocitocina no epitélio endometrial (SPENCER et al, 1996; SPENCER E BAZER, 1996; LAMMING E MANN, 1995). As concentrações de PGE₂ aumentam progressivamente entre os 15º e 20º dias da gestação, chegando próximo as concentrações de ACTH. O aumento do cortisol no momento do parto

estimula os andrógenos em estrógenos ao invés da P450 aromatase, fazendo com que a concentração de estrógeno seja proporcionalmente significativa com a P4, nesse momento é evidente o aumento de receptores de ocitocina (OTR) e produção de PGF_{2α}, resultando em contratilidade miometrial e expulsão o feto (LEUNG et al, 1999).

A presença de ER-β em placenta bovina mostrou-se evidente nas CTBs, seguido de um aumento significativo de maturação celular. As CTBs também apresentaram imunomarcção intensa, este fato deve-se ao mecanismo de migração da carúncula para a superfície do epitélio cotiledonário. Essas células, porém, exibiram características de degeneração celular, como perda citoplasmática e morfologia irregular (SCHULER et al, 2004). Isso sugere que o estrógeno está amplamente ligado ao relaxamento no canal vaginal, contrações miometriais e maturação placentária (EVANS E WAGNER, 1981). Também foi relatado em placentomas que ER-β e α estão imunolocalizados em diferentes regiões, porém foram identificados no estroma placentomal (HOFFMANN E SCHULER, 2002; SCHULER et al, 2004). Ambos receptores foram identificados no estroma caruncular e em células semelhantes a fibrócitos e em pericitos capilares. A imunorreatividade em células carunculares estromais foi de 30% ± 5,9% em vacas prenhes, e 17,5% ± 8,3% no momento do parto, porém na zona adjacente a carúncula foi mais elevada que na zona superficial (SCHULER et al, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar as características morfológicas e imunohistoquímica de cotilédones fetais de cordeiros oriundos da TE.

3.2. *Objetivos específicos*

- Identificar possíveis alterações morfológicas em cotilédones procedentes de neonatos (TE);
- Verificar diferença de imunomarcção de células binucleadas para receptores de estrógeno alfa (ER-α), beta (ER-β) e progesterona (PR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL

A presente pesquisa foi realizada após a submissão e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP Botucatu (Latitude: 22° 53' 09" sul, Longitude: 48° 26' 42" oeste), protocolo nº 140/2014 (ANEXO). Foram utilizadas placentas de 20 ovelhas da raça Santa Inês, que foram divididos em 10 animais do grupo TE e 10 controles, sem levar em consideração o sexo do neonato. As fêmeas utilizadas pesavam em média de 45,3 quilogramas, e foram mantidas no “Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos” da FMVZ - UNESP Botucatu e o grupo controle na Fazenda Querencia de Butignon em Brasília-DF (Latitude: 15,7802, Longitude: -47.9292, 15° 46' 48" sul, 47° 55' 45" oeste). Para o grupo controle, as placentas foram colhidas de neonatos oriundos de monta natural, e ambos os grupos mantidos em baias para o monitoramento do parto. Durante todo o experimento foi fornecida ração peletizada, feno, silagem de milho e sal mineral Tortuga® e água *ad libitum*.

4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o parto as placentas foram lavadas com solução de NaCl 0,9%, e foram colhidos quatro cotilédones de cada placenta de ambos os grupos de forma randômica, totalizando 80 cotilédones. O material foi fixado em formalina tamponada a 10% pH 7,4. Após esse procedimento, foi lavado em água corrente e imersos no álcool 70%. Os fragmentos foram incluídos em parafina plástica (Paraplast®) e seccionados transversalmente a 4µm e montados em lâminas silanizadas (Knitell Starfrost®). Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada no Departamento de Clínica Veterinária na área de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP Botucatu e no Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências (IBB-UNESP). O material foi corado com hematoxilina-eosina (HE), reação Pearl (para ferro), ácido periódico de Shiff (PAS) contracorado com hematoxilina de Harris, Von Kossa (para cálcio), Tricômico de Masson (Anexo). A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico no aumento de 100X e 400X.

Para avaliação das células trofoblásticas binucleadas foram colhidos dois cotilédones de três animais de cada grupo e confeccionados em blocos de historesina. Os cotilédones foram lavados com NaCl 0,9% e fixados em glutaraldeído. Após a fixação as peças foram preservadas em álcool 70% sob refrigeração até o momento do processamento. A desidratação foi realizada em álcool 95% durante 4h e a infiltração em resina plástica “Historesin” (Reichert – Jung/Embedding Kit Alemanha®) acrescida de álcool durante 4h. Os fragmentos dos cotilédones foram imersos em resina pura por 12h. As amostras de tecidos foram incluídas e transportadas para histomoldes etiquetados (histomold – LKB – Alemanha), contendo mescla de inclusão (líquido de infiltração + endurecedor). Os histomoldes foram mantidos em estufa a 60°C durante 3h. Os blocos do material incluídos foram cortados com 4µm e corados com azul de toluidina (Anexo).

4.3. MORFOMETRIA DOS COTILÉDONES FETAIS

Para mensuração utilizou-se cortes 4 µm de três amostras de cada animal de ambos grupos corados em HE, e analisados em 10 campos da amostra. Mensurou-se altura do epitélio da base ao ápice das microvilosidades em 3 regiões. As amostras foram documentadas e analisadas no aumento de 400X no fotomicroscópio (Zeiss Axio II), na sala de análise de imagem – SAI – LPIC no Departamento de Patologia Veterinária.

4.4. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA (ER-α), BETA (ER-β) E PROGESTERONA (PR)

As amostras para a reação de imunohistoquímica foram escolhidas através do “*pool*” obtidos da avaliação morfológica em HE, totalizando 24 amostras, 6 cotilédones de cada grupo para cada reação de imunohistoquímica. O material foi seccionado em 4µm em lâminas silanizadas Starfrost Knitell®.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 55°C por uma hora e em banhos crescentes de xilol I, II e III por 10 minutos. Realizou-se então a hidratação do material em banho de etanol (I, II e III e etanol a 90%, 80%, 70% e 50%), permanecendo por 3 minutos na cuba de rotina histológica. Após esse procedimento as lâminas foram submetidas a 10 passagens de água destilada.

Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução de citrato de sódio 10mM pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, em panela de pressão tipo Pascal (Dako®, USA).

Na próxima etapa realizou-se o bloqueio de peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio a 8% por 30 minutos em solução aquosa, e lavadas com água destilada por 10 vezes, e em seguida realizou-se bloqueio de reações inespecíficas com leite em pó desnatado a 3% durante 60 minutos, em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e solução tamponada TRIS-pH 7,4 (Trizma Base®- Sigma ChemicalCo, USA).

Para incubação com anticorpo primário para (PR) e estrógeno alfa (ER- α) e beta (ER- β) utilizou-se anticorpo monoclonal cat. n° 1546, Immunotech, France, e anticorpo Monoclonal Mouse monoclonal SC-311, Santa Cruz Biotechnology, Cód M7047 e ER β PPG5-10 – ABCAM- Ab – 27720, respectivamente. A incubação foi realizada em câmara úmida durante 18 horas a 4°C, e utilizou-se diluição 1:60 para PR, estabelecido por Fernandes et al (2012) e para ER α 1:50 e ER β 1:50, estabelecendo-se uma padronização.

Para os três receptores foram utilizados fragmentos de útero de ovelha como controle positivo. Para o controle negativo, utilizou-se uma lâmina com fragmento de placenta incubada sem anticorpo primário.

Após o período de incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS – pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário Histofine® (polímero hrp – Nichirei Bioscience cod. 414154f) por 30 minutos em estufa a 27°C e lavou-se novamente com solução tampão TRIS- pH 7,4, sendo realizado a revelação com o cromógeno DAB (3,3' – diaminobenzina – Liquid DAB Cromogen® - DAKO, USA), por 5 minutos, e posteriormente lavou-se novamente os cortes com tampão TRIS – pH 7,4.

Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 3 minutos e montados com resina sintética (Permound®, Fisher Scientific®). As imunomarcações das células binucleadas foram avaliadas e contadas por três observadores, em microscópio óptico em 10 campos de cada amostra por animal, totalizando 60 avaliações por receptores estudados. As células foram avaliadas de acordo com a intensidade da coloração, 1: coloração fraca em menos de 50%, 2: coloração discreta ou moderada em 50% , e 3 : coloração forte em mais de 50% (HEWITT et al, 2011).

4.5. Análise estatística

Para análise morfométrica, utilizou-se a técnica ANOVA para medidas repetidas em grupos independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (JOHNSON E WICHERN, 2007).

Para a avaliação imunohistoquímica e contagem de CTBs a utilizou-se teste não paramétrico de Mann-Whitney (NORMANN E STREINER, 2008) e teste de associação de Goodman complementado com comparações múltiplas entre e dentro de populações multinominais, considerando o nível de 5% de significância (GOODMAN, 1964; 1965).

5. RESULTADOS

5.1. Histopatologia

Em animais do grupo TE, observou-se artéria coriônica com espessamento endotelial, esclerose, veias e artérias com infiltrado inflamatório (Fig.2A). Ainda no grupo TE foram encontradas rompimento arterial, espessamento endotelial e adesão de fibrina (Fig. 2B), presença de hemossiderina no interior dos capilares com infiltrado inflamatório (Fig. 2C e 2D), veias coriônicas lesionadas e hialinização endotelial (Fig. 2E), observadas principalmente nas vilosidades primárias. Nas vilosidades terminais constatou-se presença de numerosos capilares distribuídos no cório de forma uniforme (Fig. 2F e 2G).

O grupo controle não apresentou as alterações supracitadas, sem espessamento endotelial e infiltrados inflamatório nas artérias e veias (Fig. 3A e 3B), e suas vilosidades terminais apresentaram-se delgadas e seus capilares também mostraram-se distribuídos de forma uniforme (Fig. 3C e 3D).

No epitélio coriônico do grupo TE, foram identificados pigmentos de hemossiderina (Fig. 4A), e reação positiva para Perls (Fig. 4B). Também foi possível observar epitélio com característica hiperplásica e com degeneração (Fig. 4C) devido ao acúmulo de pigmentos.

As CTBs foram localizadas no epitélio sem dificuldade e a reação de PAS mostrou-se positiva na base do epitélio e nas células trofoblásticas (Fig. 4D). Em algumas amostras do grupo TE o epitélio mostrou-se íntegro com projeção citoplasmática apical (Fig. 4E) e hipoplasia (Fig. 4F). Células trofoblásticas mostraram-se em fase de

degeneração (Fig. 5A), condensação celular, com núcleos periféricos picnóticos, sugestivo de morte celular programada (Fig. 5B e 5C) e micronúcleo (Fig. 5D). Os grupos (1 e 2) apresentaram características morfológicas similares.

No espaço intervilosos verificou-se a presença de sangue extravasado no grupo TE (Fig 6A), porém no grupo controle essa característica foi moderada (Fig. 6B) com tecido conjuntivo denso na região do cório. A presença de fosfato de cálcio foi evidente em ambos grupos, nas regiões do epitélio e do cório (Fig. 6C e 6D).

5.2. Análise morfométrica dos cotilédones fetais

A análise morfométrica demonstrou que não houve diferença estatística entre os grupos, porém entre as medidas analisadas houve diferença significativa em duas mensurações no grupo TE (M2 e M3) ($p < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis grupo e medida, TE (1) e controle (2)

Grupo	Medida			Valor de p
	M1	M2	M3	
1	51,40 (24,98) $\pm$	43,47 (4,42) $\pm$	42,93 (4,76) $\pm$	$p > 0,05$
2	50,51 (9,54) $\pm$	53,11 (11,52) $\pm$	48,28 (4,79) $\pm$	$p > 0,05$
Valor de p	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	

M1, M2 e M3 – medidas avaliadas no epitélio cotiledonário.

Figura 2– Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) Artéria coriônica com lesão perivascular (seta), esclerose (*), capilar com infiltrado inflamatório (cabeça de seta). (B) Veia com adesão de fibrina, trombo e infiltrado inflamatório e lesão (seta). (C e D). Observar artéria e veia coriônica com espessamento endotelial (barra). (E) Veia com hialinização endotelial (cabeça de seta). (F) Veia coriônica rompida e aderência de fibrina e hemossiderina (asterisco), capilar com infiltrado inflamatório (cabeça de seta). (G) Vilosidades terminais com capilares uniformemente distribuídos. (H) Veias coriônicas com presença de trombo. HE – 200X.

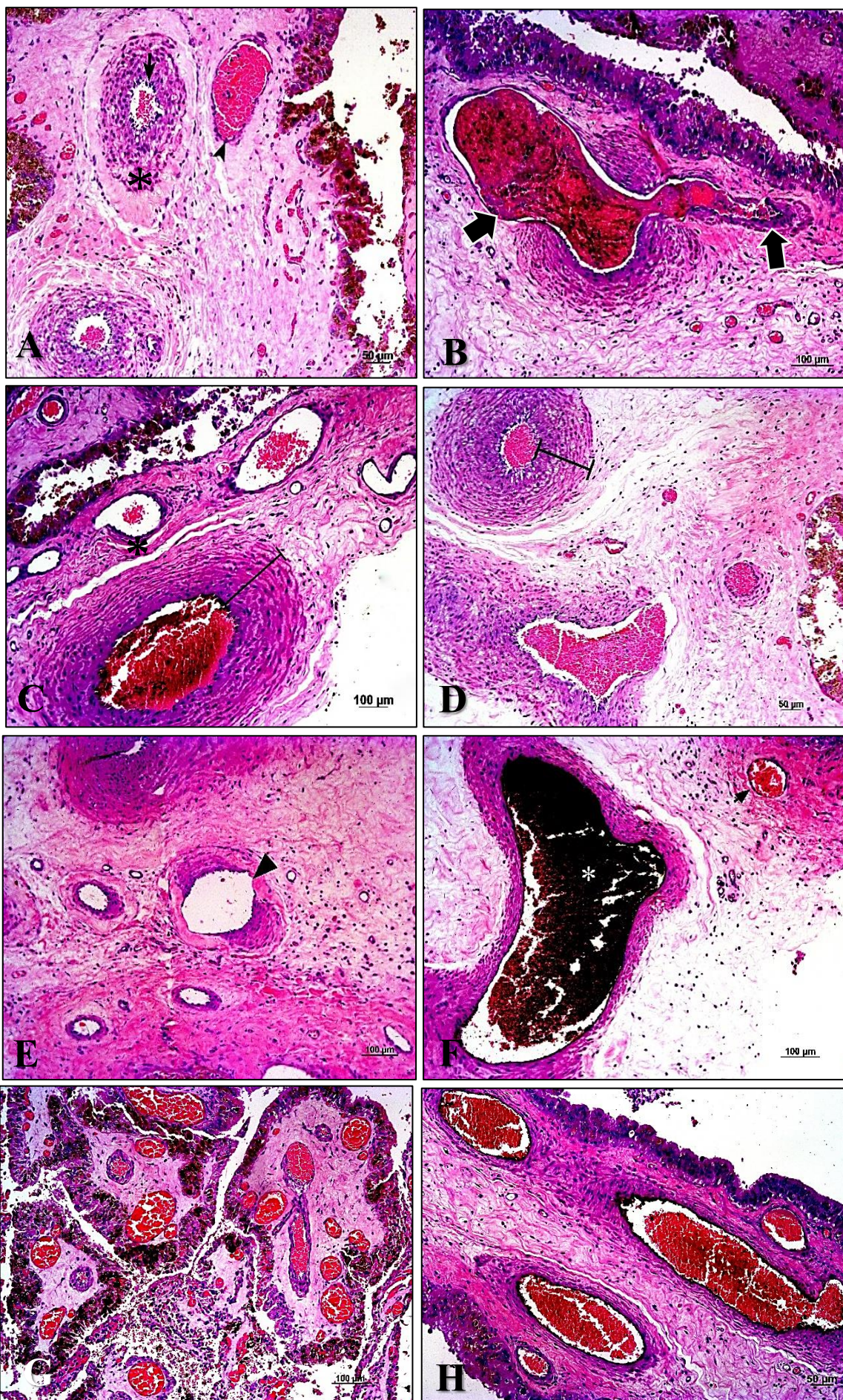


Figura 3 - Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (Controle) – (A-B) artéria coriônica sem espessamento endotelial (barra), 200X (C) artérias, veias coriônicas de vilosidade primária, (D) vilosidades com capilares com distribuição uniforme, HE – 100X

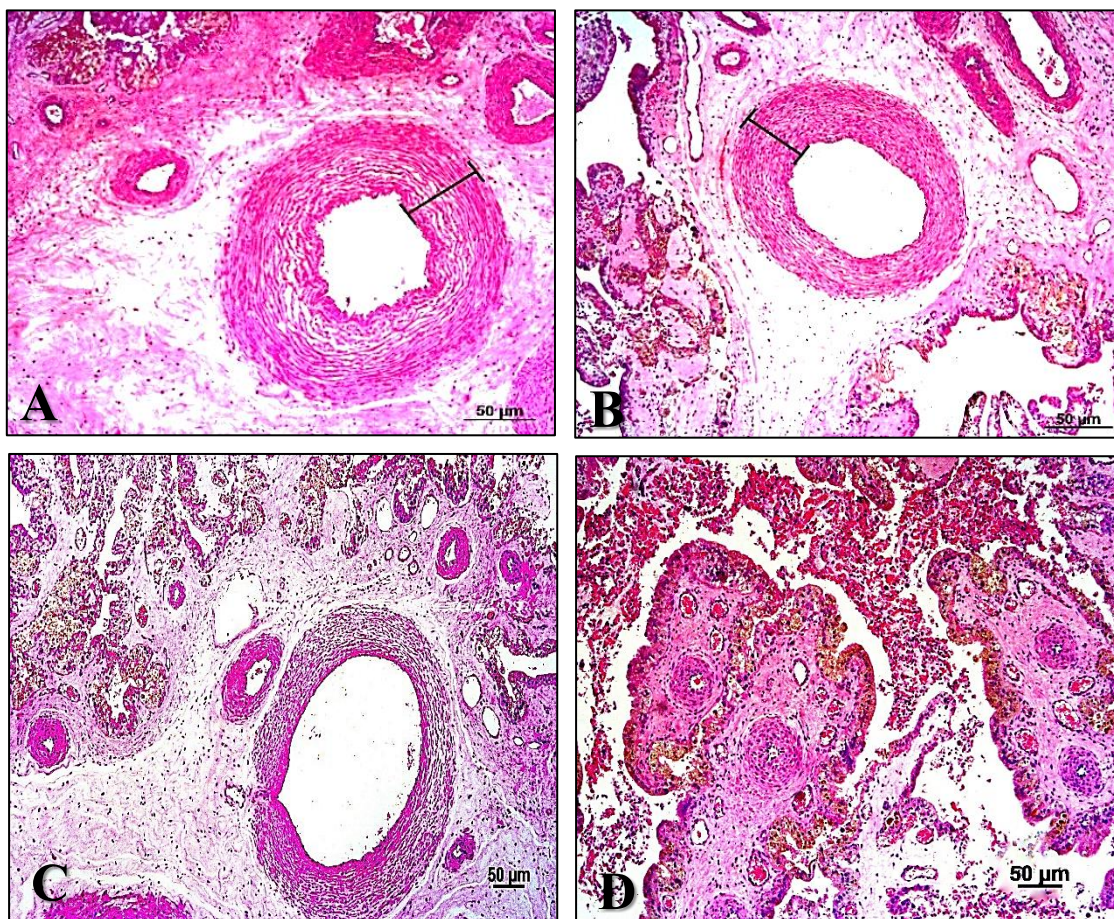


Figura 4 – Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) resalta-se o epitélio trofoblástico com pigmentos castanhos dourados (hemossiderina), HE, (B) Reação positiva de Perls (pigmento azul), (C) epitélio trofoblástico com característica hiperplásica (barra). (D) Reação PAS positiva na base do epitélio (cabeça de seta), célula trofoblástica na região do epitélio (seta). (E) epitélio trofoblástico com projeções citoplasmáticas apicais (seta), (F) característica hipoplásica do epitélio (barra), HE – 400X

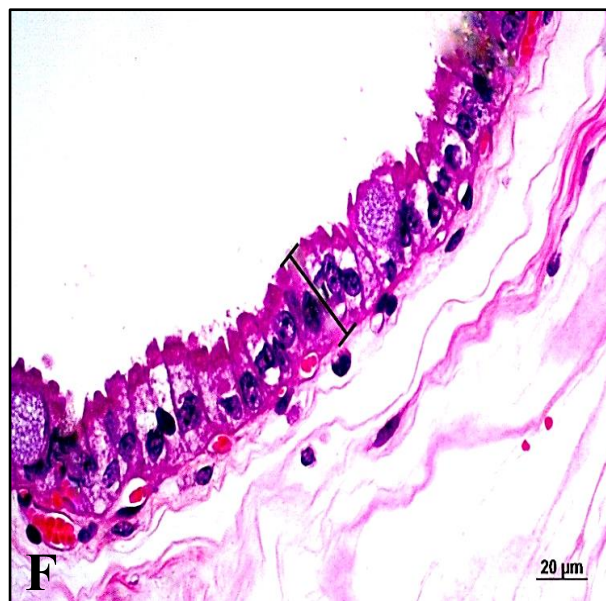
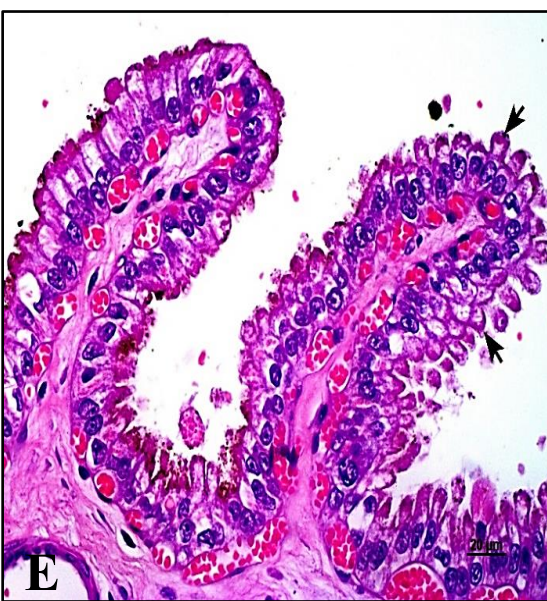
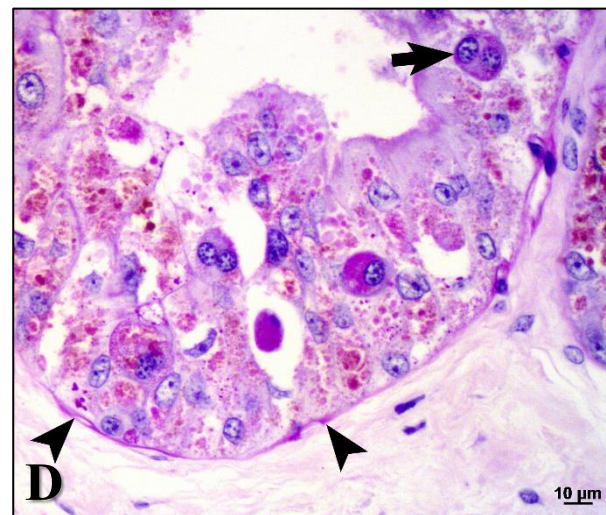
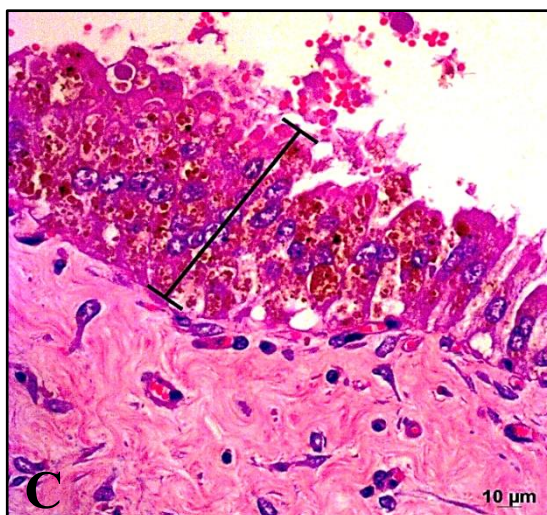
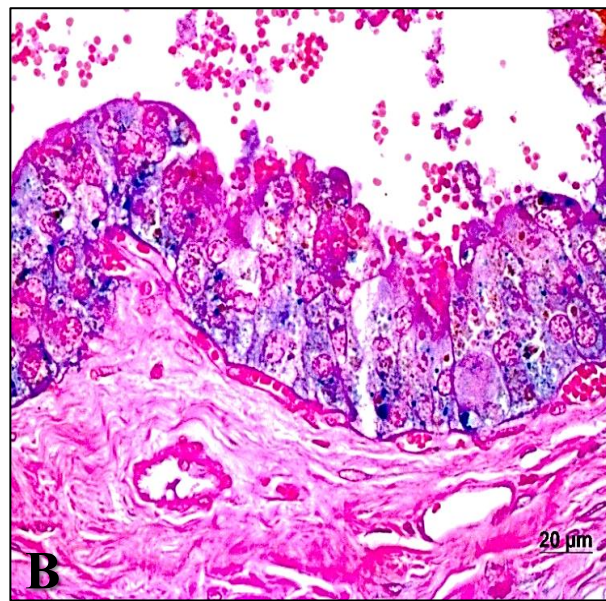
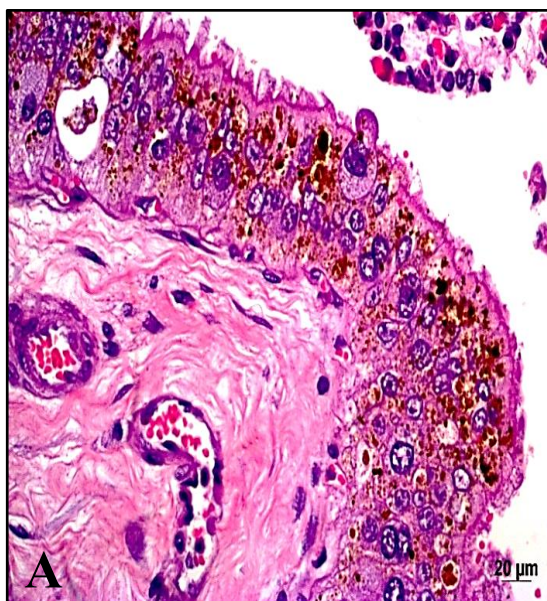


Figura 5 - Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) observar epitélio com CTBs em fase de degeneração (a-b-c-d), CTBs com características íntegras (cabeça de seta) - HE. (B- C) célula trofoblástica binucleada em condensação (seta), (D) Célula com presença de micronúcleo (cabeça de seta) azul de toluidina – historesina 400X e 630X

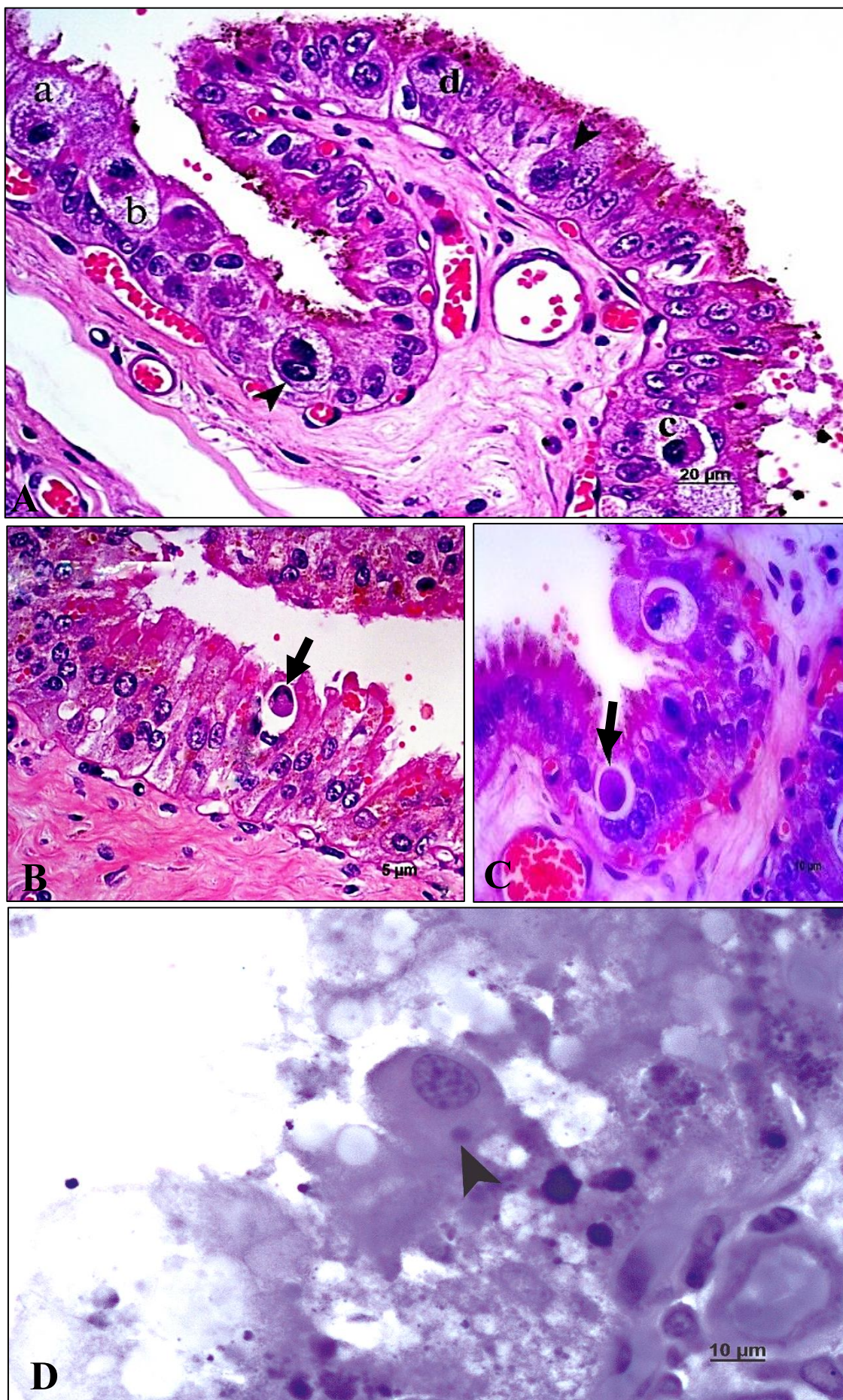


Figura 6 – Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (controle) – (A) epitélio com cristais de hemossiderina, (B) CTBs com núcleo íntegro (seta) - HE. (C) epitélio trofoblástico com projeções citoplasmáticas apicais (cabeça de seta), CTB (seta) (630X), (D) reação positiva para Perls (pigmentos azuis), 400X e 630X. (E) Reação PAS positiva, base do epitélio coriônico (cabeça de seta), célula trinucleada no epitélio coriônico (seta), HE - 400X, (E) variações na altura do epitélio (barra), 400X.

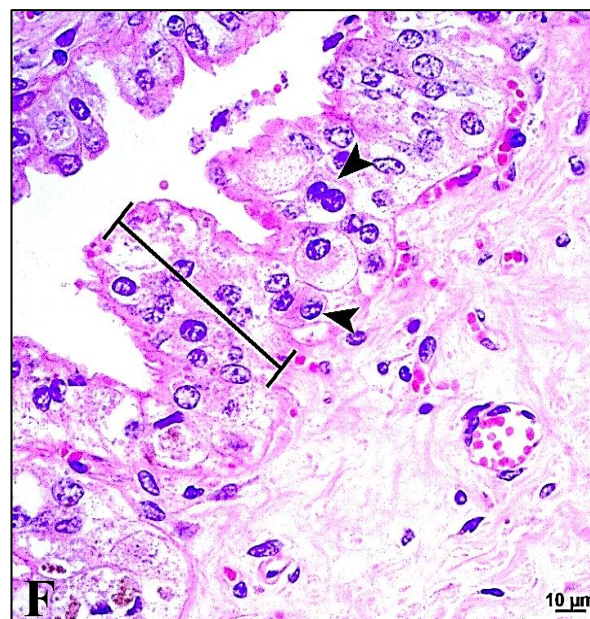
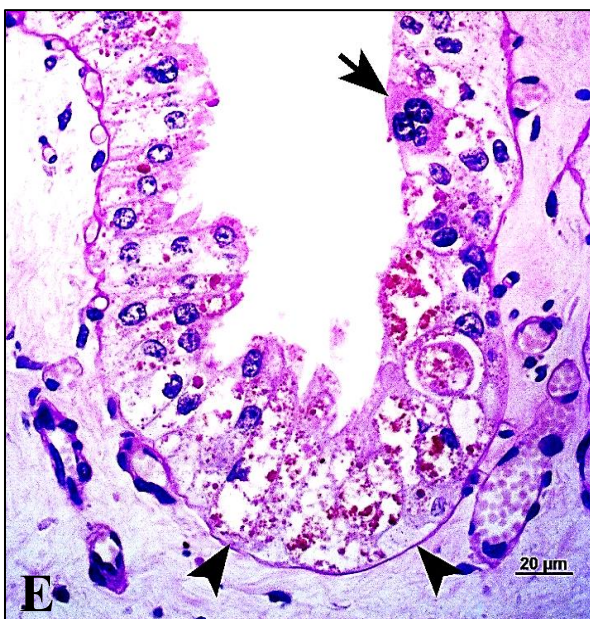
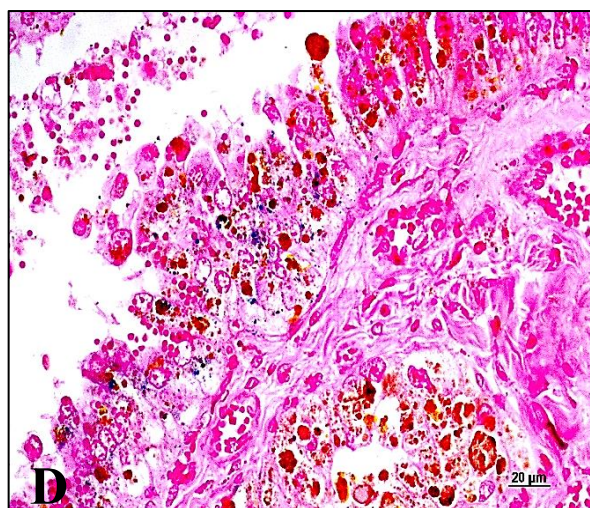
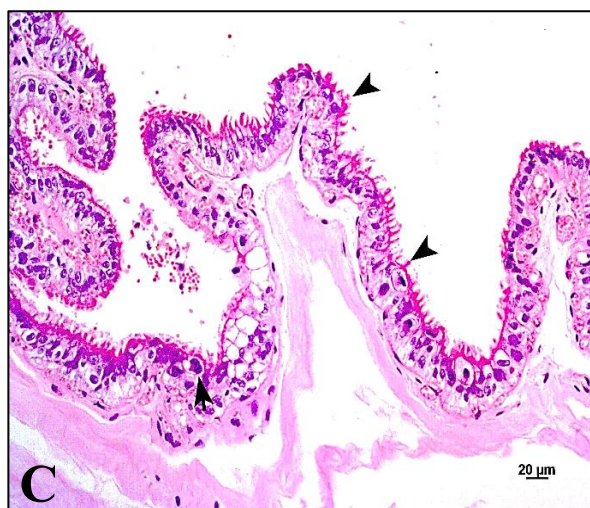
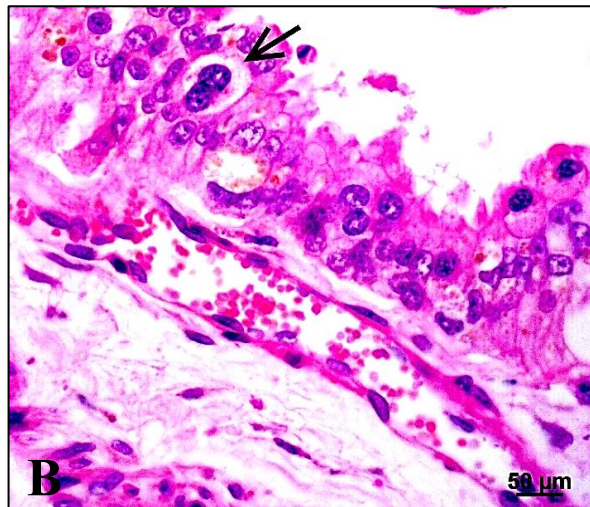
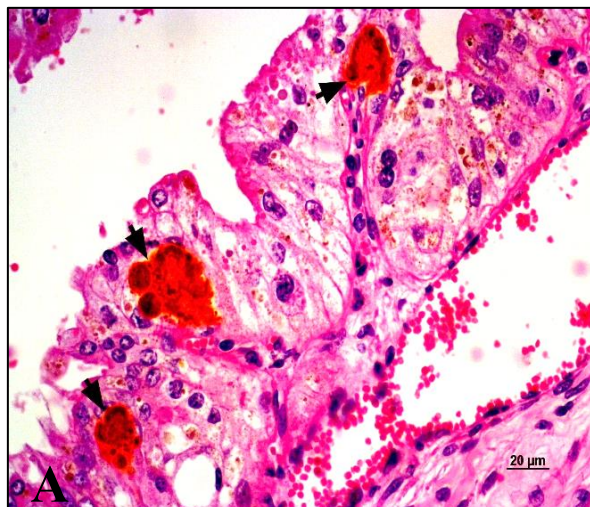
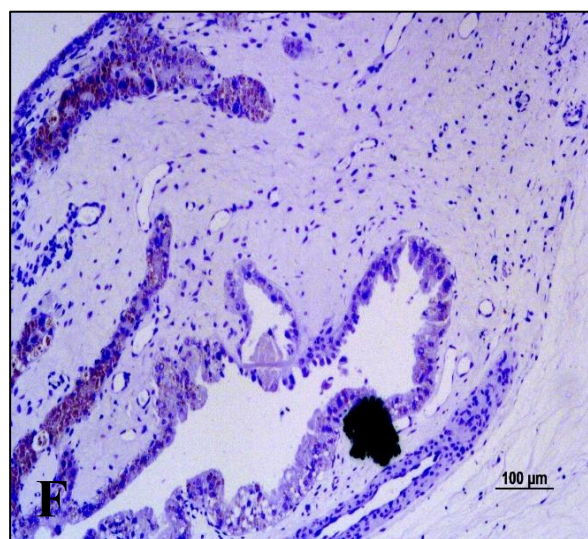
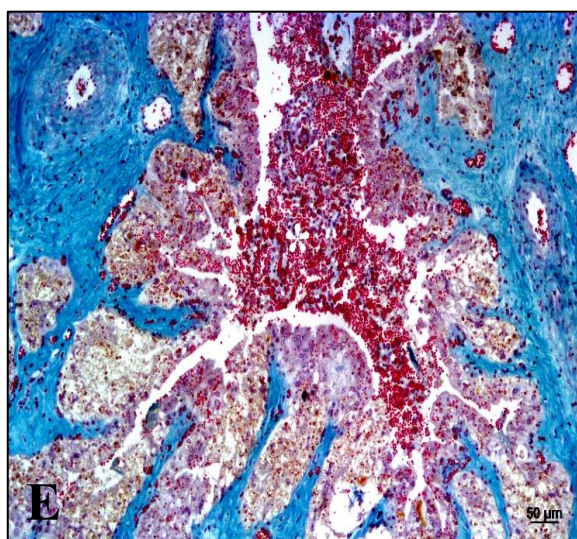
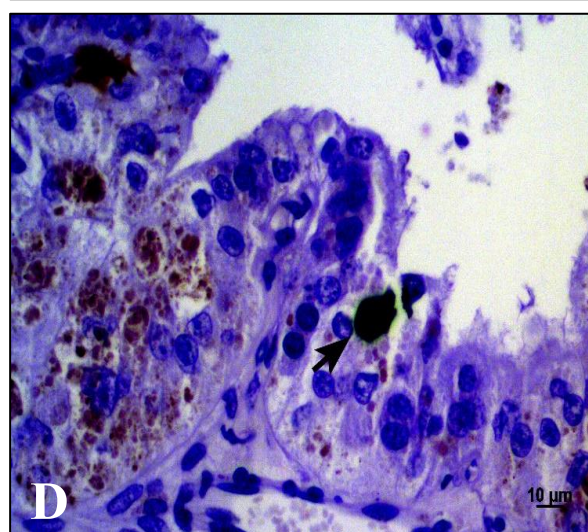
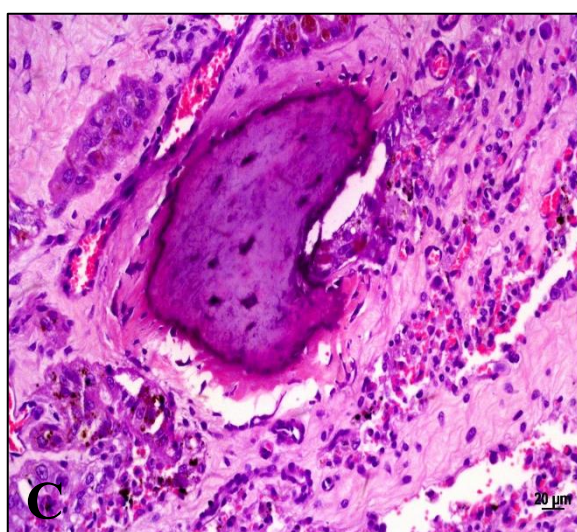
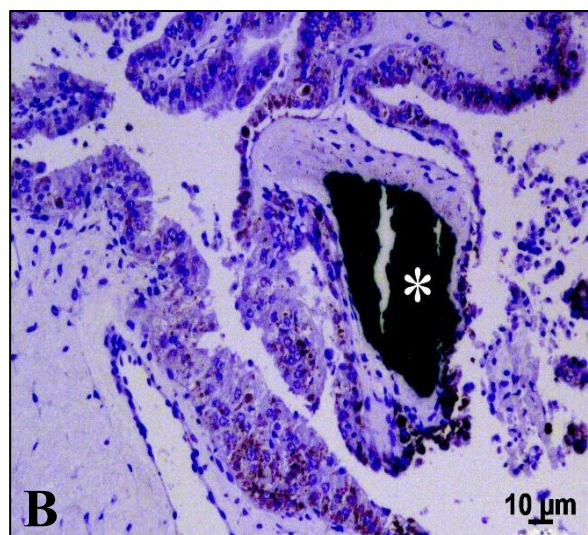
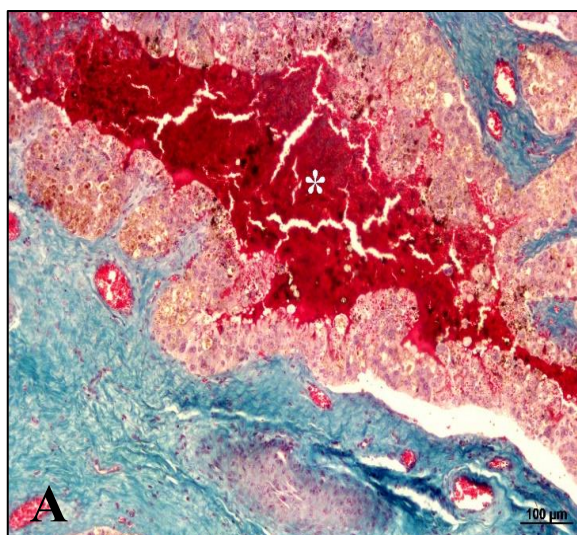


Figura 7- Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino (TE) – (A) presença de hemorragia no espaço intervilo (*), tecido conjuntivo (cório) na coloração em azul – T. masson - 200X, (B) presença de fosfato de cálcio na região do cório – Von Kossa – 100X, (C) presença de fosfato de cálcio na região do cório – HE – 100X (D) presença de hemorragia no espaço intervilo (*) grupo controle – T. masson 200X, (E) presença de fosfato de cálcio na região do cório, grupo controle (grânulo negro) – V. kossa – 100X.



5.3. Imunohistoquímica para ER- α , ER- β e PR

A imunexpressão mostrou-se moderada para receptor de progesterona em ambos os grupos tanto no citoplasma quanto no núcleo, localizando-se nas CTBs, nas células epiteliais mononucleares, nas células do cório, e paredes de vasos (fig. 8A e B), porém não houve diferença estatística entre os grupos.

No grupo TE a expressão de receptores ER- α mostraram-se negativas nas CTBs e em todo epitélio (fig. 8C). Já no grupo controle houve predominância de forte imunomarcção quando comparados ao TE (fig. 8D), havendo diferença estatística entre os grupos ($p < 0,001$), tabela 2. Ainda para ER- α no grupo TE através da avaliação de escore, foi evidente a ausência ou fraca imunorreatividade (tabela 2). Para ER- β a imunorreatividade foi positiva em todo epitélio em ambos os grupos, porém fraca para as CTBs do grupo TE (tabela 2). Também foi possível observar decréscimo de CTBs no grupo TE, independente das imunomarcações (tabela 2). Para PR, ER- β e α do grupo controle, bem como grupo TE, observou-se a imunomarcção no citoplasma e no núcleo para os receptores estudados, exceto para o grupo TE apenas para ER- α .

Tabela 2. Mediana do número total de células trofoblásticas binucleadas contadas por campo e células imunomarcadas para receptores ER- α , ER- β e PR entre os grupos TE (1) e controle (2).

Variável	Grupos				valor de p*
	TE		Controle		
Cont. total (nº/campo)	18,0	(7,0; 36,0)	27,5	(6,0; 54,0)	p=0,013
Progesterona	14,5	(3,0; 21,0)	15,5	(5,0 ; 27,0)	p>0,05
ER-β	10,00	(7,0; 13,0)	12,00	(9,0; 19,0)	p>0,05
ER-α	1,0	(0,0; 7,0)	18,0	(11,0 24,0)	p<0,001

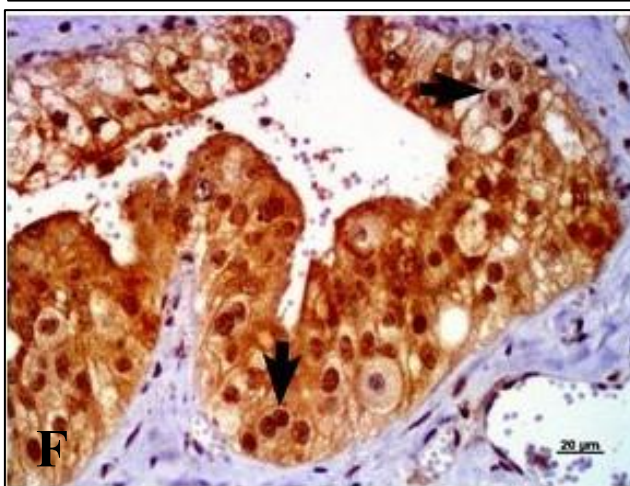
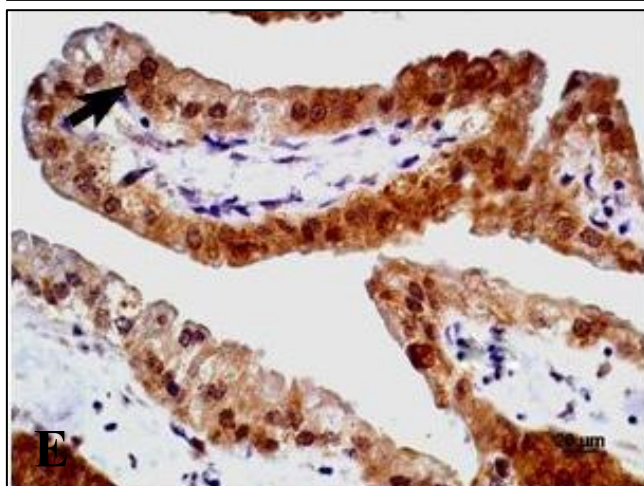
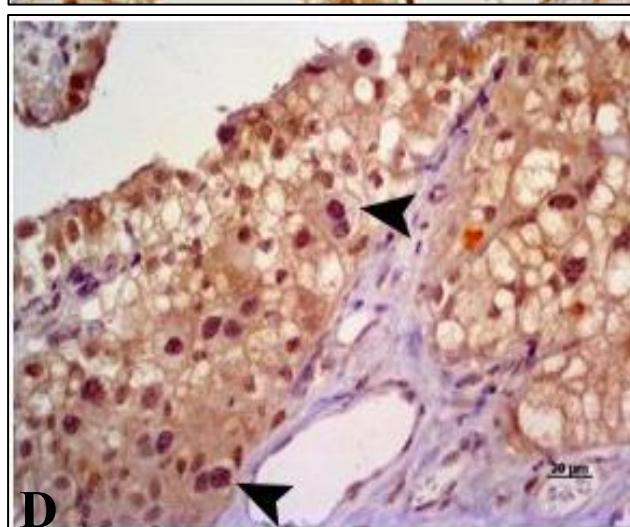
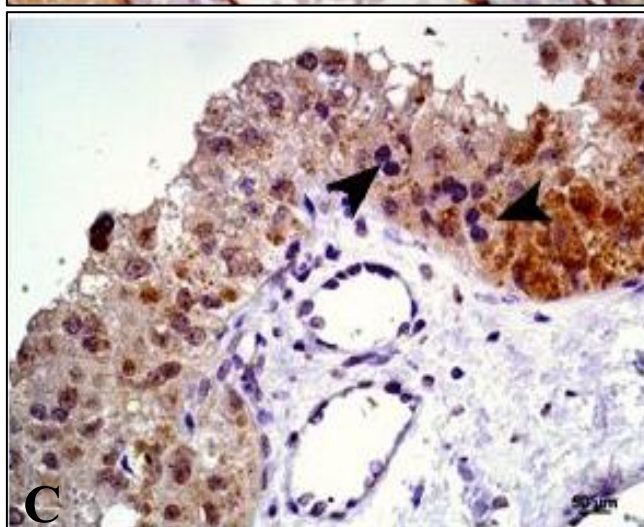
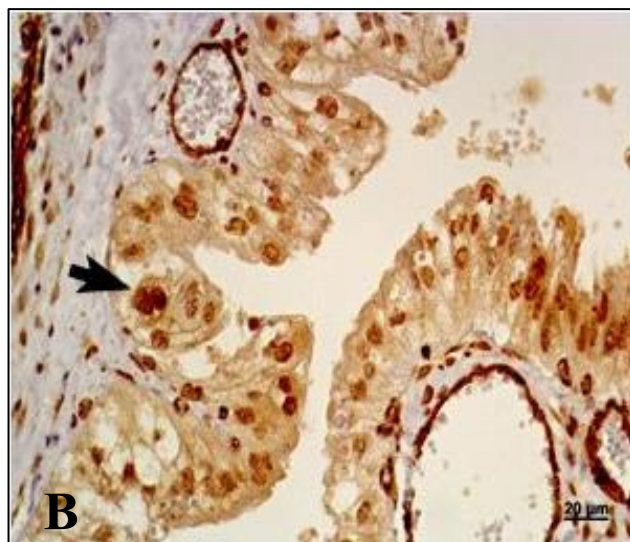
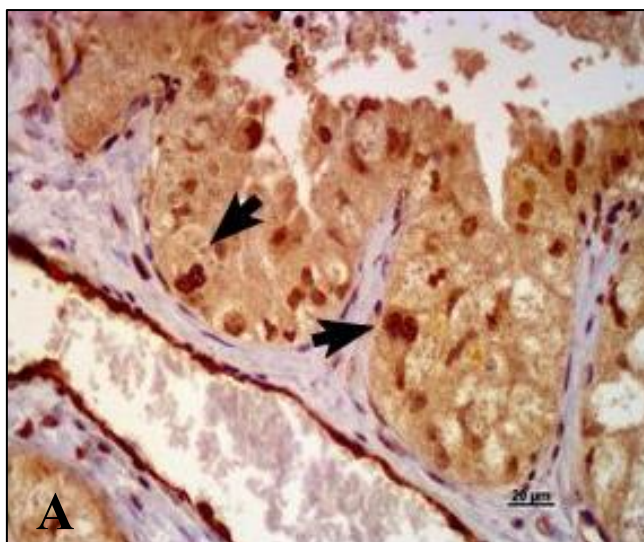
Mediana (valor mínimo e máximo), *valor de $p \leq 0,05$ indica diferença estatística

Tabela 3. Distribuição das células imunomarcadas para PR, ER- β e ER α em células trofoblásticas binucleadas segundo a distribuição de frequências das categorias de coloração e grupo.

Variável	Grupo	Categoria por escore de imunomarcção								Total
		Ausente		Fraco		Forte/fraco		forte		
PR	Controle	14 (23,3)	aA	9 (15,0)	aA	20 (33,3)	aA	17 (28,3)	aA	60
	TE	17 (28, 3)	aA	15 (25,0)	aA	20 (33,3)	aA	8 (13,3)	aA	60
ER-β	Controle	5 (8,3)	aA	31 (51,7)	aB	24 (40,0)	bB	-		60
	TE	8 (13,3)	aA	44 (73,3)	bB	8 (13,3)	aA	-		60
ER-α	Controle	6 (10,0)	aA	10 (16,7)	aB	34 (56,7)	bB	10 (16,7)	bA	60
	TE	51 (85,0)	aC	8 (13,3)	aB	0 (0,0)	aA	1 (1,7)	aA	60

n(%) Letras minúsculas: comparação de grupos (linhas) fixada categoria de resposta (coluna), letras maiúsculas: comparação de categorias de resposta (colunas) dentro do grupo (linha).

Figura 8— Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino TE e controle – (A) CTBs imunomarcadas por PR grupo TE (seta), (B) imunomaração positiva para PR nas CTBs (seta), grupo controle. (C) Ausência de imunorreatividade grupo TE, CTBs com ausência de ER- α (cabeça de seta). (D) Presença de ER- α grupo controle, CTBs com imunorreatividade positiva (seta). (E) Fraca imunorretividade para ER β , grupo TE, observar CTBs com fraca imunomarcação (cabeça de seta), (F) Imunoexpressão positiva para ER- β grupo controle, imunorreacção presente nas CTBs (seta), 400X.



6. DISCUSSÃO

A prática de TE vem sendo aprimorada e estudada, porém não há relatos de alterações placentárias observadas em partos eutócicos pelo uso desta biotecnologia na espécie ovina, sendo uma ferramenta alternativa que agregue ao rebanho produtos geneticamente superiores.

No presente estudo, observou-se no grupo TE junto as árvores vilosas primárias, formação de trombos em artérias e veias. Alterações similares foram encontradas em placentas de mulheres diabéticas e tabagistas (FOX E PATH 1966). Contudo, observou-se espessamento e lesão endotelial, acúmulo de fibrina em veias e artérias em cotilédones do grupo TE. Lesões vasculares na placenta geralmente estão relacionados a alterações na formação arterial, e são comumente encontradas em placentas em condições normais (REDLINE, 2009). As lesões vasculares encontradas frequentemente em placentas humanas são descritas na literatura como trombose, obstrução mecânica, degeneração de veias e artérias e perda de capilares nos vilos coriônicos (REDLINE et al, 2004).

Entretanto, achados como acúmulo de fibrina, trombo e necrose, possuem características similares em placentas normais pós-parto, idênticas aquelas descritas por Buxton et al (2002). Nas árvores vilosas primárias notaram-se infiltrados inflamatórios em sua vascularização, estando evidente em todos animais do grupo TE. As alterações vasculares encontradas no presente estudo, mostraram-se ser similares as alterações em placentas humanas, sugerindo relação com características hipertensivas ou eclampsia no momento pré-parto e pós-parto (RAYNE E KRAUS, 1993). Também foi encontrado espessamento endotelial no grupo TE. O endotélio vascular desempenha muitas funções importantes a disfunção endotelial inicia-se em casos pré-existentes de hipertensão crônica, diabetes mellitus, danificando o endotélio vascular (KRAUS., et al 1999).

Vasculites e arterites corioalantóica, são sugestivas de placentites, assim como descrito por Buxton et al (2002). A placentite é decorrente de infecções bacterianas, que podem ser causadas por *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*), *Brucella sp*, *Coxiella burnetti*, *Toxoplasma gondii* na espécie ovina (BUXTON, 1998; SAMMNIN et al, 2006).

Em placenta humana alterações vasculares com infiltrados inflamatórios são similares aos que encontramos na espécie estudada, porém, recebem denominações de acordo com sua localização, como corioamnionite e vilosites que possivelmente estão relacionados aos processos infecciosos durante a gestação, podendo afetar o crescimento

fetal desenvolvimento do sistema nervoso e causar morte intrauterina (REDLINE, 2009; KHONG., 2004; KRAUS., et al 1999; STALLMACH E HEBISCH., 2004; REDLINE et al., 2004)

O acúmulo de hemossiderina na maior parte do epitélio e no cório e extravasamento sanguíneo nas áreas intervilosas foram observadas em ambos os grupos, e são condizentes a eritrofagocitose. Portanto, os resultados do presente estudos são similares aos descritos por Santos et al (1996), que evidenciaram a presença de hemossiderina no epitélio trofoblástico em cotilédones caprinos, o qual está presente nos hematomas. A eritrofagocitose também foi evidenciada aos 146 dias de gestação estando presente na maioria dos ruminantes, sendo responsável por suprir a passagem de ferro constatado por (MYAGKAYA, 1981). Em bovinos aos 9 meses de gestação, Cazerta et al (2007) observaram eritrofagocitose na base dos vilos e entre os epitélios trofoblástico e uterino. Em placentas de bufalinos (*Bubalus bubalis bubalis*) os hematomas estão presentes na base dos vilos aos 9 e 10 meses de prenhez (PEREIRA et al, 2001),

Epitélio degenerado e hiperplásico também foram encontrados no presente estudo e em algumas regiões do epitélio trofoblástico constatou-se integridade celular com projeções citoplasmáticas apicais. Características similares foram encontradas em retenções placentárias em ovinos por Björkman (1969), em seus estudos valendo-se da microscopia eletrônica, descrevendo o epitélio trofoblástico com características degenerativas, as quais foram encontradas em diversas fases da gestação em placentas bovinas. Para Björkman a degeneração do epitélio é um processo normal durante a separação dos tecidos fetais. O cotilédone bovino nesse período, demonstrou estar envolvido em tecido epitelial e *debri* celular, e as CTBs permaneceram intactas conforme (HOLM et al, 1964).

Sabe-se que a placenta é um órgão temporário, entretanto há poucos relatos sobre calcificação. Sammin et al (2009) encontraram fragmentos calcificados em cotilédones pós-parto na região do cório. No presente experimento a calcificação foi evidente não só no cório mas também em diversas regiões do epitélio, sendo coincidente com os relatos abaixo mencionados. Em placentas de partos eutócicos em cadelas, encontrou-se também calcificações no labirinto placentário (COSTA, 2015). Através da ultrassonografia é possível identificar a calcificação em placentas humanas durante a gestação identificadas como pontos densos hiperecogênicos e diferentes localizações (GRANNUM et al, 1979), relacionados como fator limitante ao desenvolvimento fetal (HANEY E TROUGHT, 1980). Entretanto, para Bervely et al (1981), a calcificação é um processo fisiológico sem

significados clínicos. O processo de calcificação aumenta no decorrer da gestação e a mineralização corresponde a um mecanismo fisiológico, distrófico ou metastático (POGGI et al, 2001; SPIRT et al. 1982).

No epitélio do grupo controle observou-se células trinucleadas ou multinucleadas, com um núcleo central sob dois núcleos superiores, entretanto no grupo TE não foi constatado a presença dessas células. Wooding et al (1984) encontraram células em divisão no epitélio durante a gestação. Nessa fase observaram formação de células trinucleadas, que iniciam sua formação no sincício das carúnculas adjacentes ao embrião, estendendo-se para as carúnculas das proximidades. A área intercaruncular passa por transformação, e as células trinucleadas migram para o sincício, resultando em fusão das CTBs com as células maternas. Em bovinos clonados observaram a presença de células trinucleadas aos 270 dias de gestação (FERNANDES et al, 2002). Diferentes autores verificaram em bovinos que as células trinucleadas são capazes de sintetizar hormônio lactogênio placentário, porém em ovinos a fusão de célula materna e CTBs caracterizam a célula trinucleada como híbrida (WOODING E BECKER, 1987; WOODING, 1984; WOODING et al, 1996).

No decorrer dos estudos, as CTBs mostraram ser importantes para o desenvolvimento placentário, bem como pela sua capacidade em sintetizar hormônios específicos durante a gestação. Em ovinos a P4 é responsável pela manutenção da gestação, porém isso ocorre devido a habilidade da placenta em assumir esta função endócrina. As CTBs sintetizam e secretam P4 até a fase final da gestação (KOLIGIAN e STORMSHAK, 1976). De maneira similar observou-se reação positiva para PR não havendo diferença entre os grupos, na expressão de PR nas CTBs, nas células mononucleadas, e a expressão de PR nos tipos celulares foi nuclear e citoplasmática. Para Fernandes et al (2002) não houve forte imunomarcção para PR em bovinos clonados entre os dias 68 e 135 de prenhez, já aos 225 e 270 a forte imunorreção foi evidente nas CTBs.

Também foi observado em nosso estudo a imunoexpressão positiva para PR nas artérias e veias coriônicas, coincidentes com o achado por Schuler et al (1999) em placentomas bovinos, sugerindo atuação parácrina de P4 na gestação. Em ovinos as CTBs são capazes de converter a P5 em P4 (WANGO et al, 1991), e esta capacidade é sugestiva na produção de P4 nas CTBs, indicando que a P4 seja de origem fetal. Também foi possível observar decréscimo de CTBs em cotilédones de gestações obtidas por TE. De

acordo com Wooding et al (1993) há redução significativa das CTBs em placentas normais até o momento do parto, sendo também observada por Ward et al (2002).

No presente estudo verificou-se nula ou fraca imunoexpressão de ER- α no epitélio do grupo TE e CTBs, entretanto no grupo controle mostrou-se evidente em todo epitélio e nas células do cório. Em placentomas de vacas Schuler et al (2002) observaram a expressão de ER- α nas CTBs, e o mesmo foi encontrado no grupo controle utilizado neste experimento na espécie ovina.

Em ovinos durante o parto há um aumento significativo de cortisol, agindo diretamente na síntese e no metabolismo de hormônios esteroides da placenta (LIGGINS, 1994; CLARKE et al, 2002). Estrógenos conjugados aumentam significativamente no momento do parto, redundando no aumento da prostaglandina-2 (PGE₂) da placenta, que por sua vez age no tecido uterino (CHALLIS et al, 2000). A ausência de ER- α no grupo TE, possivelmente está relacionada ao aumento de PGF2 α e P4, resultando no decréscimo da ER- α , destacando assim sua importância no momento do parto. A intensa expressão de PR está relacionada a inibição do ER- α , sugerindo ação parácrina entre ambos receptores. (RAWDEN E LEAVITT, 1980). É possível obter bloqueio de estrógeno placentário com aplicação de inibidor de P450 aromatase aos 90 dias gestacionais, sendo responsável pelo aumento da concentração de P4 e PGE, indicando que o estrógeno possui função importante na síntese de P4 (WEENS et al, 2001).

A imunolocalização positiva para ER- β em cotilédones pós-parto mesmo que moderado em todo epitélio e CTB, foi similar aos achados Schuler et al (2005) que relataram a expressão de ER- β sendo de forma moderada no epitélio e nas CTBs. Recentes estudos com ER- β nas carúnculas e nos placentomas, sugeriram que os estrógenos livres são produzidos pelo trofoblasto e estão envolvidos na diferenciação e na regulação do crescimento fetal (SCHULER et al, 2002).

7. CONCLUSÃO

No presente estudos conclui-se que as alterações vasculares estão relacionadas as adaptações de ambiente fetal-uterino ou são causas de hipertensão e os infiltrados inflamatórios são sugestivos para placentite. Outros achados como as degenerações e hiperplasias são características do mecanismo de expulsão da placenta no momento do parto. A variação da mensuração e a característica hiperplásica do epitélio em ambos os grupos, são condizentes à eritrofagocitose, deslocamento e liberação da placenta e essa

alteração deve-se à maturação placentária nos momentos que antecedem o parto. O presente estudo demonstrou que a diferença da imunoexpressão entre os receptores de ER- α e ER- β do grupo TE que estão relacionados ao mecanismo do parto e aos níveis de hormônios adrenocorticotróficos como prostaglandinas e cortisol, possuindo relação direta com estrógenos livres. Porém a ausência de ER- α em cotilédones de neonatos de TE demonstraram regulação hormonal negativa, já que os estrógenos livres são importantes para síntese de P4 e são produzidos principalmente pela glândula adrenal fetal. O decréscimo de células binucleadas observadas no grupo TE, possuem característica de adaptação ao ambiente uterino, também devemos considerar o fato que a placenta é pós-parto, a qual poderão apresentar células com características de morte celular, sendo que esta estrutura não possui função após a sua expulsão.

8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Devido à presença de infiltrados inflamatórios encontrados em cotilédones de ovelhas gestantes saudáveis, com parto eutócido e neonatos normais há necessidade da busca de respostas que justifiquem os sinais histológicos da placentite nessa espécie.

As diferenças entre os receptores de ER- α e ER- β nos cotilédones entre os grupos 1 e 2 deverão ser validados com a utilização das técnicas de PCR e Westernblot, sendo possível a obtenção de uma resposta mais fidedigna que justifiquem as diferenças entre os receptores.

REFERÊNCIAS

- ANTHONY, R. V. et al. The growth hormone/prolactin gene Family in ruminant placentae. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 83-95, 1995.
- ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, p. 623-634, 2001.
- ALMEIDA, J. M. et al. Artérias e veias placentárias de ovinos deslançados sem raça definida (*Ovis aries*, L. 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 194-199, 2000.
- ARNETT-MANSFIELD, R. L. et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. **Cancer Research**, v. 11, p. 4576-4582, 2001.
- APLIN, J. D.; HEY, N. A. Endometrium and embryo implantation. **Biochemical Society**, v. 23, p. 826-831, 1995.
- BAZER, F. W. et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive Biology**, v. 8, p. 179-211, 2008.
- BAZER, F. W. et al. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, p. 195-209, 2009.
- BAZER, D. P.; OTT, L. T.; SPECENCER, T. E. Maternal recognition of pregnancy: comparative aspects: a review. **Placenta**, v. 19, suppl. 2, p. 375-386, 1998.
- BOSHIER, D. P.; HOLLOWAY, H. The sheep trophoblast and placental function: an ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v. 124, p. 284-298, 1977.
- BJÖRKMAN, N. Fine structure of the ovine placentome. **Journal of Anatomy**, v. 2, p. 283-297, 1965.
- BJÖRKMAN, N. H. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **The Anatomical Record**, v. 163, p. 17-29, 1969.

- BJÖRKMAN, N. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of Ultrascture Research**, v. 24, p. 249-258, 1968.
- BURTON, G. J.; JAUNAIUX, E. Maternal vascularisation of the human placenta: Does embryo develop in a hipoxic enviroment? **Gynécologie Obstétrique and Fertilité**, v. 29, p. 503-508, 2001.
- BUXTON, D. Protozoan infenctions (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sacocystis sp) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary Research**, v. 29, p. 289-310, 1998.
- BUXTON, D. et al. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory imune response in placental tissues. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 133-141, 2002.
- BRANDENBERGER, W. A. et al. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 3509-3512, 1997.
- BROLIO, M. P. et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 222-232, 2011.
- CARTER, A. M. Evolution of factors affecting placental oxygen transfer. **Placenta Trophoblast Research**, v. 23, p. 19-25, 2009.
- CARTER, M. A.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 32-46, 2004.
- CARTER, M. A.; ENDERS, A. C. The evolution of epitheliocorial placentation. **Annual Review Animal Bioscience**, v. 1, p. 443-467, 2013.
- COSTA, I. F. **Análise morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas provenientes de eutocia e distocia**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.
- CAZERTA, S. M. M. et al. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 229-235, 2007.

CLARKE, K. et al. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal cortisol. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 527-534, 2002.

CROSS, J. C. Genes, Development and evolution of the placenta. **Placenta**, v. 24, p. 123-130, 2003.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Veterinary physiology**. Missouri: Saunders Elsevier, 2007. 720p.

COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what we learned and where will they lead us? **Endocrine Reviews**, v. 20, p. 358-417, 1999.

COWLEY, S. M.; PARKER, M. G. A comparison of transcriptional activation by ER α and ER β . **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 165-175, 1999.

CHALLIS, J. R. et al. Endocrine and paracrine regulation of birth and preterm 1. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 514-550, 2000.

DIEL, P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 217-224, 2002.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. What can comparative studies tell us? A review. **Placenta**, v. 25, p. 3-9, 2004.

EVANS, G.; WAGNER, W. C. In vitro oestrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition. **Acta Endocrinológica**, v. 98, p. 119-125, 1981.

FERNANDES, V. M. et al. Comparação da imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e clonados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 194-198, 2002.

FOWDEN, A. L. et al. Programming placental nutrient transport capacity. **Journal of Physiology**, v. 572, p. 5-15, 2006.

FOX, H.; PATH, M. C. Thrombosis in foetal arteries in the human placenta. **International Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 73, p. 961-965, 1966.

GAMBLING, L. et al. Fetal iron status regulates maternal metabolism during pregnancy in the rat. **American Journal of Physiology Integrative Comparative Physiology**, v. 296, p. 1063-1070, 2009.

GAVIRIA, M. T.; HERNANDEZ, A. Morphometri of implantation in sheep. Trophoblast attachment, modification of the uterine lining, conceptus size and embryo location. **Theriogenology**, v. 41, p. 1139-1149, 1994.

GOYER, R. A. Transplacental transport of lead. **Environment Health Perspectives**, v. 89, p. 101-105, 1990.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial population. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 25, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Thecnometricsm**, v. 7, p. 247-254, 1965.

GRANNUM, P. A.; BERKOWITZ, R. L.; HOBBS, J. C. The ultrasonic changes in the maturing placenta and their relation to fetal pulmonic maturity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 133, p. 915-922, 1979.

GRAY, C. A. et al. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1608-1613, 2001.

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

GRUBER, J. C. et al. Production and actions of estrogens. **England Journal of Medicine**, v. 346, p. 340-352, 2002.

GUILLEMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surface of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in cow. **Anatomy Record**, v. 204, p. 315-322, 1982.

- HANEY, A. F.; TROUGHT, W. S. The sonolucent and seasonal difference. **American Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 55, p. 38-41, 1980.
- HARDMAN, O.; PILLAY, O. S.; ATIOMO, W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. **The Lancet**, v. 361, p. 1810-1812, 2003.
- HEWITT, S. M.; ROBINOWITZ, M.; BOGEN, S. A. **Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays**: approved guideline. 2. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. (CLSI document I/LA28-A2).
- HANDWERGER, S. C. et al. Studies on ovine placental lactogen secretion by homologous radioimmunoassay. **Journal of Endocrinology**, v. 72, p. 27-34, 1977.
- HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta: a source and target of steroids hormones: observation during the second half gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 309-320, 2002.
- HOLM, W. L.; SALVATORI, C.; ZEEK-MINNING, P. The histology of postern bovine placenta. **Anatomical Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 88, p. 479-489, 1964.
- HRADECKY, P.; MOSSMAN, H. W.; SCOTT, G. G. Comparative development of ruminant placentomes. **Theriogenology**, v. 29, p. 715-729, 1988.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 23, p. 1-39, 2014.
- JOHNSON, R. A; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statical analysis**. 6. ed. New Jersey: Practice-Hall, 2007. 800p.
- KOEHLER, K. F. et al. Reflections on the Discovery and significance of estrogen receptor β . **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 465-478, 2005.
- KHONG, T. Y. Placental vascular development and neonatal outcome. **Seminars in Neonatology**, v. 9, p. 255-263, 2004.
- KOLIGIAN, K. B.; STORMSHAK, F. Progesterone Synthesis by ovine fetal cotyledons. **Journal of Animal Science**, v. 42, p. 439-443, 1976.

- KRAUS, F. T.; ACHEEN, V. I. Fetal thrombotic vasculopathy in the placenta: cerebral thrombi and infarcts, coagulopathies, and cerebral palsy. **Human Pathology**, v. 30, p. 759-769, 1999.
- KREBS, C.; LONGO, L. D.; LEISER, R. Term ovine placental vasculature: comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. **Placenta**, v. 18, p. 43-51, 1997.
- LABRIE, F. et al. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, p. 185-212, 2001.
- LACERDA, P. M. O. **Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de ovinos clonados**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F_{2α} production in cows by progesterone and estradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 69-73, 1995.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.
- LEUNG, S. T. et al. Effect of labor induction on the expression of oxytocin receptor, cytochrome P450 aromatase, and estradiol receptor in the reproductive tract of the late-pregnant ewe. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 814-820, 1999.
- LEUNG, Y. et al. Estrogen receptor (ER)- β isoforms: A key to understanding ER- β signaling. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 103, p. 13162-13167, 2006.
- LEVIN, E. R. Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1860-1867, 2001.
- LIGGINS, G. C. The role of cortisol in preparing the fetus for birth. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 141-150, 1994.

MATT, D. W.; MACDONALD, G. J. Placental steroid production by basal and labyrinth zones during the later third of gestation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 969-977, 1985.

MAJEED, A. F.; AL-SADI, H. I.; RIDHA, A. M. Ovine placenta related to binucleated cells membrane retention. **Small Ruminant Research**, v. 17, p. 97-99, 1995.

MAJEED, A. F.; SHALAL, M. S.; MOHAMMED T. R. Histology of the ovine placenta during gestation periods. **Kufa Journal for Veterinary Medicine Science**, v. 2, p. 163-611, 2011.

MYERS, E. et al. Inverse relationship between ER β and SRC-1 predicts outcome in endocrine resistant breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 91, 1687-1693, 2004.

MIGLINO, M. A. et al. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.

MILLER, W. L. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. **Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 12, p. 67-81, 1998.

MORGAN, G.; WHYTE, A.; WOODING, F. B. P. Characterization of the synthetic capacities of isolated placental binucleate cells from sheep and goats. **Anatomical Record**, v. 226, p. 27-36, 1990.

MURPHY, J. W. et al. Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. **Genome Research**, v. 17, p. 413-421, 2007.

MYAGKAYA, G.; SCHELLENS, J. P. M. Final stages of erythrophagocytosis in the sheep placenta. **Cell and Tissue Research**, v. 214, p. 501-518, 1981.

NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. **Biostatistics: the bare essentials**, 3.ed. St. Louis: Mosby year book, 2008. 393p.

OLIVEIRA, M. C.; RODRIGUES, M. N.; MIGLINO, M. A. Iron transportation across the placenta. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 1115-1120, 2012.

O'MALLEY, C. D.; SAUNDERS, C. M. Os cadernos Anatômicos de Leonardo Da Vinci. Ed. Unicamp, p. 515, 2012.

PASQUALINI, J. R. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 97, p. 401-415, 2005.

PELLETIER, G.; EL-ALFY, M. Immocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 4835-4840, 2000.

PEREIRA, F. T. V. et al. Aspectos morfológicos dos hematomas placentários da placenta de búfalo (*Bubalus bubalis* – Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 38, p. 151-154, 2001.

PINTO, L. M. et al. Comportamento células gigantes binucleadas na placenta de vacas nelore (*Bos indicus* – Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 110-121, 2008.

POGGI, S. H. et al. Placental calcification: a metastatic process? **Placenta**, v. 22, p. 591-596, 2001.

RAYNE, S. C.; KRAUS, F. T. Placental thrombi and other vascular lesions. Classification, morphology and clinical correlations. **Pathology Research Practice**, v. 189, p. 2-17, 1993.

RAWDEN, W. E.; LEAVITT, W. W. Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: Dependence on RNA and protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 5856-5860, 1980.

REDLINE, R. W. Severe fetal placental vascular lesions in term infants neurologic impairment. **American of Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 452-457, 2004.

REDLINE, R. W. Disorders of placental circulation and the fetal brain. **Clinics in Perinatology**, v. 36, p. 549-559, 2009.

REDLINE, R. W. et al. Fetal vascular obstructive lesion: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. **Pediatrics and Development Pathology**, v. 7, p. 443-452, 2004.

- REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, p. 1625-1630, 2005.
- REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 1227-1236, 1985.
- RICKETTS, A. P.; FLINT, A. P. F. Onset of synthesis of progesterone by ovine placenta. **Journal of Endocrinology**, v. 86, p. 337-347, 1980.
- ROA, I.; SMOK, S. I. C.; PRIETO, G. R. E. Placenta: anatomia e histologia comparada. **International of Journal Morphology**, v. 30, p. 1490-1496, 2012.
- SAMMIN, D. et al. The ovine placenta and placentitis – a review. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 90-97, 2009.
- SANTOS, R. L. et al. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. **Theriogenology**, v. 46, p. 1077-1083, 1996.
- SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 145-160, 2000.
- SCHOENAU, L. et al. Aspectos anatômicos damacro e microvascularização da placenta em ovinos (*Ovis aries*). **Brazilian Journal Veterinary and Research Animal Science**, v. 42, p. 405-413, 2005.
- SCHULER, G. et al. Immunolocalization of progesterone in bovine placentomes throughout mid and late gestation at parturition. **Biology of Reproduction**, v. 61, p.797-801, 1999.
- SCHULER, G. et al. Estrogen receptor β (ER β) is expressed differently from ER α in bovine placentomes. **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, v.113, p. 107-114, 2004.
- SCHULER, G. et al. Ocurrence of estrogens receptor alpha in bovine placentomes throught mid and late gestation and parturition. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 976-982, 2002.

- SPENCER, T. E. et al. Intrauterine injection of ovine interferon-tau alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 203-220, 1995.
- SPENCER, T. E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Tau interferon pregnancy recognition signal in ruminant. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 213, p. 215-229, 1996.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon-tau supresses transcription of the estrogen receptores genes in ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, p.1144-1147, 1996.
- SPENCER, T. E. et al. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1409-1418, 1999.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulation conceptos growth in domestic animals. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 4-13, 2004.
- SHANKER, Y. G.; RAO, A. J. Progesterone receptor expression. in the human placenta. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 481- 486, 1999.
- SPIRT, B. A.; COHEN, W. N.; WEINSTEIN, H. M. The incidence of placental calcification in normal pregnancies. **Radiology**, v. 142, p. 707-711, 1982.
- STALLMACH, T.; HEBISCH, G. Placental pathology: its impact on explaining prenatal and perinatal death. **Virchows Archive**, v. 445, p. 9-16, 2004.
- STEVEN, D. H. Separation of the placenta in the ewe: an ultrasctructural study. **Quartely Jornal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 60, p. 37- 44, 1975.
- SUZANA, M. M. C. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. **Pesquisa Veterinary Brasileira**, v. 27, p. 229-235, 2007.
- TELLERIA, C. M. et al. Progesterone receptor is not requerid for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. **Steroids**, v. 64, p. 760-766, 1999.

TUCKEY, R. C. Progesterone synthesis by the human placenta. **Placenta**, v. 26, p. 273–281, 2005.

VANSELOW, J.; FÜBASS, R.; TIEMANN, U. Cultured bovine trophoblast cells differentially express genes encoding key steroid synthesis enzymes. **Placenta**, v. 29, p. 531-538, 2008.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The effects of cortisol on the binucleate cell population during late gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451-458, 2002.

WARD, J. D.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. Ovine feto-placental metabolism. **Journal of Physiology**, v. 554, p. 529-541, 2003.

WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451-458, 2002.

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

WANGO, E. O.; HEAP, R. B.; WOODING, F. B. P. Progesterone and 5 β -pregnanediol production by isolated fetal binucleate cells from sheep and goats. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 283-289, 1991.

WANGO, E. O.; HEAP, R. B.; WOODING, F. B. P. Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 1, p. 203-211, 1992.

WEENS, Y. S. et al. Effect of the aromatase inhibitor CGS-16946A on pregnancy and secretion of progesterone, estradiol-17 β , prostaglandins E and F2 α (PGE; PGF 2 α) and pregnancy protein (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 66, p. 77-88, 2001.

WIMSAT, W. A. New histological observations on the placenta of the sheep. **Development and Dynamics**, v. 83, p. 391-457, 1950.

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

WOODING, F. B. P. et al. Cellular dynamics of growth in sheep and goat syneptheliochorial placentomes: na autoradiografic study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 275-283, 1993.

WOODING, F. B. P. et al. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of diferente selective synthetic capacity. **Placenta**, v. 17, p. 75-86, 1996.

WOODING, F. B. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. **Placenta**, v. 4, p. 527-539, 1982.

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

WOODING, F. B. P.; BECKER, J. F. Trinucleate cells and ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. **Cell Tissue Research**, v. 247, p. 667-673, 1987.

WOODING, F. B. P. Analysis of the estructure of the ruminant placenta. **Placenta and Trophoblast Methods and Protocols**, v. 1, p. 315-322, 2006.

WOODING, F. P. B.; BURTON, G. **Comparative placentation**. Springer: Berlin, 2008.301p.

WOODING, F. B. P. et al. Membrane dynamics during migration of placental of cells through trophoctodermal tight junctions in sheep and goats. **Cell Tissue Research**, v. 276, p. 387-397, 1994.

WOODING, F. B. P. et al. Migration of binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy. **Anatomy and Embryology**, v. 158, p. 361-370, 1980.

WOODING, F. B. P.; WATHES, C. D. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 425-430, 1990.

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

9. ARTIGO

Trabalho a ser enviado para a revista *Animal Reproduction Science*

Imunoexpressão de receptores de estrógeno alfa (ER α), beta (ER β) e progesterona (PR) em cotilédones fetais ovinos oriundos de embriões transferidos coletados no momento do parto

Lourenção, J. A. C.¹; Nakazato, N. G.¹; Costa, I. F.¹; Smith, L.¹; Lopes, Padovani, C. R.⁴; N. S.; Martinez, F. E.³; M. S.; Rocha.¹; Prestes, N. C.¹.

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP

²Instituto de Biociências – IBB – UNESP – Botucatu

Correspondência: josianebiologiabtu@yahoo.com.br, nereu@fmvz.unesp.br

Resumo

A transferência de embriões é uma ferramenta alternativa de escolha, permitindo adição de produtos geneticamente superiores, entretanto, não há relatos sobre o impacto desta técnica em placentas de ovinos. O presente estudo avaliou a imunoexpressão de receptores de estrógeno alfa (ER α), beta (ER β) e progesterona (PR) em cotilédones fetais no momento do parto. Para o estudo colheu-se 4 cotilédones fetais de 20 placentas pós-parto, 10 do grupo de transferência de embriões (TE) e 10 grupo controle. As amostras foram fixadas em (pH 7,4), posteriormente emblocados com Paraplast® e seccionados a 4 μ m. Para a técnica de imunohistoquímica, utilizou-se diluição 1:50 para ER α e ER β , 1:60 para PR. Observou-se ausência da expressão de ER α nas células trofoblásticas binucleadas (CTBs), bem como em todo epitélio no grupo TE; entretanto, a expressão de ER α foi positiva no epitélio e nas CTBs no grupo controle. Portanto, houve diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,001). Em ambos os grupos verificou-se

27 imunoexpressão positiva em todo epitélio para ER β , porém fraca para as CTBs do grupo
28 TE. A imunorreatividade para PR foi positiva em ambos os grupos, localizando-se nas
29 células epiteliais mononucleares, CTBs, células do cório e parede de vasos. Houve
30 decréscimo das CTBs no grupo TE independente dos receptores estudados. As diferenças
31 encontradas entre os receptores ER α e ER β estão relacionadas aos mecanismos
32 fisiológicos no momento do parto, ocasionando assim, *down-regulation* entre receptores
33 de PR e ER α .

34 **Palavras-chaves:** Placenta, vilosidade, epitélio, células trofoblásticas binucleadas,
35 ovelha.

36 **Introdução**

37 A placenta da espécie ovina é caracterizada em epiteliocorial e cotiledonária, é
38 composto por placentomas, o qual é formado pela junção endometrial, as carúnculas e
39 tufo vilosos, os cotilédones. As carúnculas endometriais são estruturas especializadas
40 aglandulares que se comunicam com o cório-alantóide (WOODING, 2006). Em ovelhas,
41 os cotilédones são côncavos, com árvores vilosas cilíndricas e longas e estão separados
42 por áreas intercotiledonárias de cório liso. Os vilos coriônicos são delgados e originando
43 ramificações primárias, secundárias e terciárias (LEISER E KAUFMANN, 1994;
44 PEREIRA et al, 2001; CAZERTA et al, 2007).

45 O placentoma são caracterizados pela justaposição de células do endométrio e
46 cotilédone, são denominadas células trofoblásticas binucleadas que representam 15-20%,
47 e estão presentes nas zonas juncionais e células trofoblásticas mononucleadas, que estão
48 presentes em 80-90% do placentoma (WOODING E WATHES, 1990). A principal
49 característica das CTBs é a capacidade de migração do epitélio caruncular, que está
50 adjacente a zona apical do trofoderma para as junções ocludentes, ocorrendo fusão das

51 células uterinas formando células derivadas de tecidos híbridos fetomaternais que se
52 desenvolvem na face materna (WOODING, 1992; WOODING et al, 1980). Em bovinos
53 as CTBs foram encontradas com dois ou mais núcleos, entre o 60º e 120º dias de gestação
54 e são abundantes, localizando-se próximas à zona ocludente materno fetal (PINTO et al,
55 2008). Estão em menor quantidade e são encontradas nas áreas cotiledonárias e
56 intercotiledonárias do placentoma, além de ampla capacidade de sintetização de
57 hormônios (WOODING, 1990; WOODING, 1992; MORGAN et al, 1990).

58 Também foi constatado que essas células ficam inicialmente distribuídas entre os dias 13
59 a 14 pós cobertura, logo abaixo da lâmina trofodermal na posição intra-epitelial e abaixo
60 da junção apical (WOODING, 1984). Outras características encontradas por Ward et al,
61 2002, mostraram que os núcleos são ovais e possuem grânulos na borda externa do
62 citoplasma. Essa característica também foi relatada em cabras (WANGO et al, 1990). São
63 capazes de produzir ou sintetizar hormônios, como o hormônio lactogênio placentário,
64 glicoproteínas dado à presença do retículo endoplasmático rugoso (MORGAN et al, 1990
65 e WOODING, 1992).

66 Em células binucleadas a produção de P4 parece não estar relacionada com a P4 lútea,
67 sugerindo que a P4 tem atuação parácrina na placenta (SCHULER et al, 1999).

68 Na espécie ovina a produção de P4 através da placenta ocorre a partir do 17º dia de
69 gestação, concomitante a presença das células binucleadas e ocorre em várias fases da
70 prenhez, do 50º ao 70º e 90º aos 120º (RICKETTS e FLINT, 1980). O LH pode servir
71 como substrato para produção esteroidogênica, sendo que a produção de progesterona nos
72 dias estudados é o suficiente para manutenção da gestação (KOLIGIAN e
73 STORMSHAK, 1976).

74 Em ruminantes, o interferon-tau (IFN-t) e estradiol são responsáveis pela ação anti-
75 luteolítica do CL para o reconhecimento materno. O INF-t bloqueia a expressão de

76 receptores de ER- α , evitando assim, a estimulação do estrógeno e de receptores de
77 ocitocina (SPENCER E BAZER, 1996). Aos 10 e 21 dias de gestação o IFN-t é secretado
78 em alta quantidade pelo embrião, evitando o aumento de ER- α e receptores de ocitocina
79 (OTR) no epitélio endometrial (SPENCER et al, 1995; LAMMING et al, 1995).

80 A presença de ER- β em placenta bovina mostrou-se evidente nas CTBs, seguido de um
81 aumento significativo de maturação celular. As CTBs também apresentaram
82 imunomarcção intensa, este fato deve-se ao mecanismo de migração da carúncula para
83 a superfície do epitélio cotiledonário. Essas células, porém, exibiram características de
84 degeneração celular, como perda citoplasmática e morfologia irregular (SCHULER et al,
85 2004). Isso sugere que o estrógeno está amplamente ligado ao relaxamento no canal
86 vaginal, contrações miométriais e maturação placentária (EVANS E WAGNER, 1981).
87 Também foi relatado em placentomas que ER- β e α estão imunolocalizados em diferentes
88 regiões, porém foram identificados no estroma placentomal (HOFFMANN E SCHULER,
89 2002). Ambos receptores foram identificados no estroma caruncular e em células
90 semelhantes a fibrócitos e em pericitos capilares. A imunorreatividade em células
91 carunculares estromais foi de 30% $\pm$ 5,9% em vacas prenhes, e 17,5% $\pm$ 8,3% no
92 momento do parto, porém na zona adjacente a carúncula foi mais elevada à zona
93 superficial (SCHULER et al, 2002).

94 Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo analisar a expressão de ER α , ER β e
95 PR em cotilédones fetais ovinos provenientes de TE colhidos no momento do parto.

96 **Material e métodos**

97 A presente pesquisa foi realizada após a submissão e aprovação da Comissão de Ética no
98 Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP Botucatu de protocolo nº 140/2014. Foram
99 utilizadas placentas de 20 ovelhas da raça Santa Inês, e foram divididos em 10 animais
100 do grupo TE e 10 controles. Os animais utilizados tinham peso médio de 45,3

quilogramas, e foram mantidos no “Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos” da FMVZ - UNESP Botucatu e o grupo controle na Fazenda Querencia de Butignon em Brasília-DF. Para o grupo controle, as placentas foram colhidas a partir de animais obtidos através de monta natural, e mantidos em baias para o monitoramento do parto. Durante todo o experimento foi fornecida ração peletizada, feno, silagem de milho e sal mineral Tortuga® e água *ad libitum*.

Análise imunohistoquímica

As amostras para a reação de imunohistoquímica foram escolhidas através do “pool” obtidos da avaliação morfológica em H.E., 24 amostras, 6 cotilédones de cada grupo para cada reação de imunohistoquímica, O material foi seccionado em 4µm em lâminas silanizadas Starfrost Knitell®.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 55°C por uma hora e em banhos crescentes de xilol I, II e III por 10 minutos. Realizou-se então a hidratação do material em banho de etanol (I, II e III e etanol a 90%, 80%, 70% e 50%), permanecendo por 3 minutos em cuba. Após esse procedimento as lâminas foram submetidas a 10 passagens de água destilada.

Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução de citrato de sódio 10mM pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, em panela de pressão tipo Pascal (Dako®, USA).

Na próxima etapa realizou-se o bloqueio de peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio a 8% por 30 minutos em solução aquosa, e lavadas com água destilada por 10 vezes, e em seguida realizou-se bloqueio de reações inespecíficas com leite em pó desnatado a 3% durante 60 minutos, em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e solução tamponada TRIS-pH 7,4 (Trizma Base®- Sigma ChemicalCo, USA).

126 Para incubação com anticorpo primário para progesterona (PR) e estrógeno alfa (ER α) e
127 beta (ER β) utilizou-se anticorpo monoclonal cat. nº 1546, Immunotech, France, e
128 anticorpo Monoclonal Mouse monoclonal SC-311, Santa Cruz Biotechnology, Cód
129 M7047 e ER β PPG5-10 – ABCAM- Ab – 27720, respectivamente. A incubação foi
130 realizada em câmara úmida durante 18 horas a 4°C, e utilizou-se diluição 1:60 para PR,
131 estabelecido por Fernandes et al (2012) e para ER α 1:50 e ER β 1:50.

132 Para os três receptores foram utilizados fragmentos de útero de ovelha como controle
133 positivo. Para o controle negativo, utilizou-se uma lâmina com fragmento de placenta
134 incubada sem anticorpo primário.

135 Após o período de incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com
136 solução tampão TRIS – pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário Histofine[®]
137 (polímero hrp – Nichirei Bioscience cod. 414154f) por 30 minutos em estufa a 27°C e
138 lavou-se novamente com solução tampão TRIS- pH 7,4, sendo realizado a revelação com
139 o cromógeno DAB (3,3' – diaminobenzina – Liquid DAB Cromogen[®] - DAKO, USA),
140 por 5 minutos, e posteriormente lavou-se novamente os cortes com tampão TRIS – pH
141 7,4.

142 Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 3 minutos e montados
143 com resina sintética (Permunt[®], Fisher Scientific[®]). As imunomarcações das células
144 binucleadas foram avaliadas e contadas por três observadores, em microscópio óptico em
145 10 campos de cada amostra por animal, totalizando 60 avaliações por receptores
146 estudados. As células foram avaliadas de acordo com a intensidade da coloração, 1:
147 coloração fraca em menos de 50%, 2: coloração forte em menos de 50% ou fraca em
148 menos de 50%, e 3: coloração forte em mais de 50% (HEWITT et al, 2011).

149 Análise estatística

150 Para a avaliação imunohistoquímica e contagem de CTBs a utilizou-se teste não
151 paramétrico de Mann-Whitney (NORMANN E STREINER, 2008) e teste de associação
152 de Goodman complementado com comparações múltiplas entre e dentro de populações
153 multinominais, considerando 5% de significância (GOODMAN, 1964; 1965).

154 **Resultados**

155 A imunoexpressão mostrou-se moderada para PR em ambos os grupos, localizando-se
156 nas CTBs, nas células epiteliais mononucleares, nas células do cório, e paredes de vasos
157 (fig. 1A e B), porém não houve diferença estatística entre os grupos, também foi visível
158 imunomarcção citoplasmática e nuclear.

159 No grupo TE a expressão de receptores ER- α mostraram-se negativas nas CTBs e em
160 todo epitélio (fig. 1C). Já no grupo controle houve predominância de forte
161 imunomarcção comparados ao TE (fig. 1D), havendo diferença estatística entre os
162 grupos ($p < 0,001$), tabela 1. Ainda para ER α no grupo TE através da avaliação de escore,
163 foi evidente a ausência ou fraca imunorreatividade (tabela 2). Para ER- β a
164 imunorreatividade foi positiva em todo epitélio em ambos os grupos, porém fraca para as
165 CTBs do grupo TE (tabela 2). Também foi possível observar decréscimo de CTBs no
166 grupo TE, independente das imunomarcações (tabela 1). Para PR, ER- β e α do grupo
167 controle, bem como grupo TE, observou-se a imunomarcção no citoplasma e no núcleo
168 para os receptores estudados, exceto para o grupo TE apenas para ER- α .

169

170

171

172

173

174

175

176 Tabela 1. Mediana do número de células (CTBs) contadas e porcentagem de células
 177 imunomarcadas para os receptores ER α , ER β e PR nos grupos controle e TE

Variável	Grupo				valor de p*
	Controle		TE		
Cont. total (nº/campo)	27,5	(6,0; 54,0)	18,0	(7,0; 36,0)	p=0,013
Progesterona (%)	15,5	(5,0; 27,0)	14,5	(3,0; 21,0)	p>0,05
ER-β (%)	12,5	(9,0; 19,0)	10,00	(7,0; 13,0)	p>0,05
ER-α (%)	18,0	(11,0;24,0)	1,0	(0,0; 7,0)	p<0,001

178 Mediana (valor mínimo e valor máximo); Valor de p $\leq$ 0,05 indica diferença estatística entre os grupos.

179

180 Tabela 2. Distribuição de células imunomarcadas para PR, ER- β e ER α segundo
 181 distribuição de frequências das categorias de coloração e grupo

Variável	Grupo	Categoria por escore de imunomarcção								Total
		Ausente		Fraco		Forte/fraco		forte		
PR	Controle	14 (23,3)	aA	9 (15,0)	aA	20 (33,3)	aA	17 (28,3)	aA	60
	TE	17 (28, 3)	aA	15 (25,0)	aA	21 (33,1)	aA	8 (13,3)	aA	60
ER-β	Controle	5 (8,3)	aA	31 (51,7)	aB	24 (40,0)	bB	-		60
	TE	8 (13,3)	aA	44 (73,3)	bB	8 (13,3)	aA	-		60
ER-α	Controle	6 (10,0)	aA	10 (16,7)	aB	34 (56,7)	bB	10 (16,7)	bA	60
	TE	51 (85,0)	aC	8 (13,3)	aB	0 (0,0)	aA	1 (1,7)	aA	60

182 n(%) Letras minúsculas: comparação de grupos (linhas) fixada categoria de resposta (coluna), letras
 183 maiúsculas: comparação de categorias de resposta (colunas) dentro do grupo (linha).

184

185

186

187

188

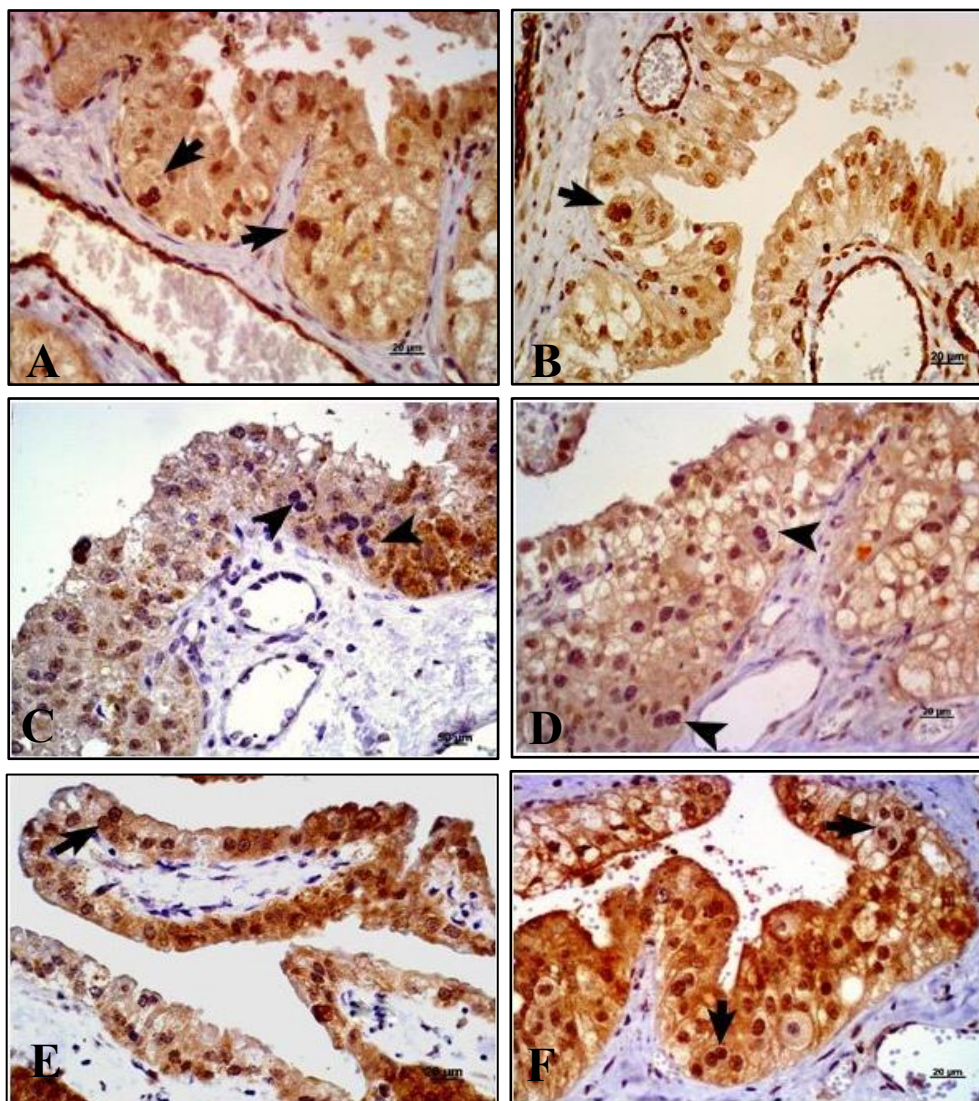


Fig. 1 – Fotomicrografia de cotilédone fetal ovino TE e controle – (A) observar as CTBs imunomarcadas por PR grupo TE (seta), (B) imunomaração positiva para PR nas CTBs (seta), grupo controle (C) Ausência de imunorreatividade grupo TE, CTBs com ausência de ER α (cabeça de seta). (D) Presença de ER α grupo controle, observar CTBs com imunorreatividade positiva (seta). (E) Fraca imunorretividade para ER β , grupo TE, observar CTBs com fraca imunomarcção (cabeça de seta), (F) Imunoexpressão positiva para ER β grupo controle, imunorreação presente nas CTBs (seta), 400X.

189 **Discussão**

190 A prática de TE vem sendo aprimorada e estudada, porém não há relatos de
191 alterações placentárias observadas em partos eutócicos pelo uso desta biotecnologia na
192 espécie ovina, sendo uma ferramenta alternativa de escolha que garanta ao rebanho a
193 adição de produtos geneticamente superiores.

194 No decorrer dos estudos, as CTBs mostraram ser importantes para o
195 desenvolvimento placentário, bem como sintetizar hormônios específicos durante a
196 gestação. Em ovinos a P4 é responsável pela manutenção da gestação, porém isso ocorre
197 devido ao estabelecimento da placenta. As CTBs sintetizam e secretam P4 até a fase final
198 da gestação (KOLIGIAN e STORMSHAK, 1976). De maneira similar experimento foi
199 possível observar reação positiva para PR não havendo diferença entre os grupos, a
200 expressão de PR nas CTBs e nas células mononucleadas, a expressão de PR nos tipos
201 celulares foi nuclear e citoplasmática. Para Fernandes et al (2002) não houve forte
202 imunomarcção para PR em bovinos clonados entre os dias 68 e 135 de prenhez, já aos
203 225 e 270 a forte imunorreação foi evidente nas CTBs.

204 Também foi observado em nosso estudo a imunoexpressão positiva para PR nas
205 artérias e veias coriônicas, coincidentes com o achado por Schuler et al (1999) em
206 placentomas bovinos, sugerindo atuação parácrina de P4 na gestação. Em ovinos as CTBs
207 são capazes de converter a P5 em P4 (WANGO et al, 1991), e esta capacidade é sugestivo
208 sugere da produção de P4 nas CTBs, indicando que a P4 seja de origem fetal. Também
209 foi possível observar decréscimo de CTBs em cotilédones de gestações obtidas por TE.
210 De acordo com Wooding et al (1993) há redução significativa das CTBs em placentas
211 normais até o momento do parto, sendo também observada por Ward et al (2002).

212 No presente estudo verificou-se nula imunoexpressão de ER- α no epitélio do
213 grupo TE e CTBs, entretando no grupo controle mostrou-se evidente em todo epitélio e

214 nas células do cório. Em placentomas de vacas Schuller et al (2002) observaram a
215 expressão de ER- α nas CTBs. E o mesmo foi encontrado no grupo controle utilizado
216 neste experimento na espécie ovina.

217 Em ovinos durante o parto há um aumento significativo de cortisol, agindo
218 diretamente na síntese e no metabolismo de hormônios esteroides da placenta (LIGGINS,
219 1994; CLARKE et al, 2002). Estrógenos conjugados aumentam significativamente no
220 momento do parto, redundando no aumento da prostaglandina-2 (PGE₂) da placenta, que
221 por sua vez age no tecido uterino (CHALLIS et al, 2000). A ausência de ER- α no grupo
222 TE, possivelmente está relacionada ao aumento de PGF₂ α e P4, resultando no decréscimo
223 da ER- α , destacando assim sua importância no momento do parto. A intensa expressão
224 de PR está relacionada a inibição do ER- α , sugerindo ação parácrina entre ambos
225 receptores. (RAWDEN E LEAVITT, 1980). É possível obter bloqueio de estrógeno
226 placentário com aplicação de inibidor de P450 aromatase aos 90 dias gestacionais, sendo
227 responsável pelo aumento da concentração de P4 e PGE, indicando que o estrógeno
228 possui função importante na síntese de P4 (WEENS et al, 2001).

229 A imunolocalização positiva para ER- β em cotilédones pós-parto mesmo que
230 moderado em todo epitélio e CTB, foi similar aos achados Schuler et al (2005) que
231 relataram a expressão de ER- β sendo de forma moderada no epitélio e nas CTBs. Recentes
232 estudos com ER- β nas carúnculas e nos placentomas, sugeriram que os estrógenos livres
233 são produzidos pelo trofoblasto e estão envolvidos na diferenciação e na regulação do
234 crescimento fetal (SCHULER et al, 2002).

235 Conclusão

236 . Para os receptores estudados, a ausência de ER- α no grupo TE se refere ao
237 mecanismo de regulação hormonal negativa, isto é, esta amplamente relacionado aos
238 mecanismos fisiológicos e regulação de prostaglandinas, cortisol e progesterona no
239 momento do parto.

240

241

242 **Referências**

243 COSTA, I. F. Análise morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas
 244 provenientes de eutocia e distocia. 2015. 59. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia
 245 Animal). Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, FMVZ, UNESP, Botucatu.

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

249 CLARKE, K.; WARD, J. W.; FORHEAD, A. J.; GIUSSANI, D. A.; FOWDEN, A. L.
 250 Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal
 251 cortisol. **Journal of endocrinology**, v. 172, p. 527-534, 2002.

252 CHALLIS, J. R.; MATHEWS, S. G.; GIBB, W.; LYE, S. J. Endocrine and paracrine
 253 regulation of birth and preterm 1. *Endocrine reviews*, v. 21, p. 514-550, 2000.

254 EVANS, G.; WAGNER, W. C. In vitro oestrogen synthesis by bovine placenta during
 255 pregnancy and induced parturition. **Acta endocrinológica**, v. 98, p. 119-125, 1981.

256 FERNANDES, V. M.; ALOIA, T. P. A.; WILL, S. E.; AMBRÓSIO, C. E.;
 257 FRANCIOLLI, A. L. R.; MIGLINO, M. A.; RICI, R. E. G. Comparação da
 258 imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e
 259 clonados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 194-198, 2002.

260 GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial
 261 population. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 25, p. 716-725, 1964.

262

263 GOODMAN, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions,
 264 **Thecnometricsm**, v. 7, n. 2m p. 247-254, 1965.

265 HEWITT, S. M.; ROBINOWITZ, M.; BOGEN, S. A. Quality assurance for design
 266 control and implementation of immunohistochemistry assays: approved guideline. 2. Ed.
 267 Wayne: **Clinical and Laboratory Standarts Institute**. 2011. (CLSI document I/LA28-
 268 A2).

- 269 HOFFMANN, B; SCHULLER, G. The bovine placenta: a source and target of steroids
270 hormones: observation during the second half gestation. **Domestic Animal**
271 **Endocrinology**, v. 23, p. 309-320, 2002.
- 272 KOLIGIAN, K. B.; STORMSHAK, F. Progesterone Synthesis by ovine fetal cotyledons.
273 **Journal of animal Science**, v. 42, p. 439-443, 1976.
- 274 LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and
275 prostaglandin F2 α production in cows by progesterone and estradiol. **Journal of**
276 **reproduction and fertility**, v. 103, p. 69-73, 1995.
- 277 LEISER, R; KAUFMANN, P. Placental structure: in comparative aspect. **Experimental**
278 **and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.
- 279 LIGGINS, G. C. The role of cortisol in preparing the fetus for birth. **Reproduction,**
280 **Fertility and development**, v. 6, p. 141-150, 1994.
- 281 MORGAN, G; WHYTE, A; WOODING, F. B. P Characterization of the synthetic
282 capacities of isolated placental binucleate cells from sheep and goats. **Anatomical**
283 **Record**, v. 226, 1990.
- 284 NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. Biostatistics: the base Essentials year book, St.
285 Louis, 2008, 393p.
- 286 PEREIRA, F. T. V; MIGLINO, M. A; BEVILAQUA, E; CARVALHO, A. F. Aspectos
287 morfológicos dos hematomas placentários da placenta de búfalo (*Bubalus bubalis* –
288 Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of veterinary Research Animal Science**, v. 38, n.
289 4, p. 151-154, 2001.
- 290 PINTO, L. M.; AMBRÓSIO, C. E.; TEIXEIRA, D. G.; ARAÚJO, K. P. C.; JÚNIOR, J.
291 C. M.; MORINI, A. C.; RICI, R. E. G.; FERREIRA, G. J. B. C.; MARTINS, D. S.;
292 MIGLINO, M. A. Comportamento células gigantes binucleadas na placenta de vacas
293 nelore (*Bos indicus* – Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.
294 32, p. 110-121, 2008.
- 295 RAWDEN, W. E.; LEAVITT, W. W. Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen
296 receptor: Dependence on RNA and protein synthesis. **Proceedings of the National**
297 **Academy of Sciences**, v. 77, p. 5856-5860, 1980.

- 298 SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; PFARRER, C.; LEISER, R.; HOFFMANN,
299 B. Immunolocalization of progesterone in bovine placentomes throughout mid and late
300 gestation at parturition. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 797-801, 1999.
- 301 SCHULER, G.; TEICHMANN, U.; TAUBERT, U.; FAILING.; HOFFMANN, B.
302 Estrogen receptor β (ER β) is expressed differently from ER α in bovine placentomes.
303 **Experimental and Clinical and Endocrinology Diabetes**, v. 113, p. 107-114, 2004.
- 304 SCHULER, G.; WIRTH, C.; TEICHMANN, U.; FAILING, K.; LEISER, R.; THOLE,
305 H.; HOFFMAN, B. Ocurrence of estrogens receptor alpha in bovine placentomes
306 throught mid and late gestation and parturition. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 976-
307 982, 2002.
- 308 SCHULER, G.; TEICHMANN, U.; TAUBERT, A.; FAILING, K; HOFFMANN, B.
309 Estrogen Receptor β (ER β) Is expressed differently from ER α in bovine placentomes.
310 **Experimental and clinical endocrinolgy and diabetes**, v. 11, p. 107-114, 2005.
- 311 SPENCER, T. E.; ING, N. H.; OTT, T. L.; MAYERS, J. S.; BECKER, W. C.; WALSON,
312 G. H.; MIRANDO, M. A.; BAZER, F. W. Intrauterine injection of ovine interferon-tau
313 alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic
314 ewes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 203-220, 1995.
- 315 SPENCER, T. E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Tau interferon pregnancy recognition signal
316 in ruminant, **PSEBM**, v. 213, p. 215-229, 1996.
- 317 SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon-tau supresses transcription of the
318 estrogen receptores genes in ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, p. 1144-1147,
319 1996.
- 320 WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The effects of cortisol on the
321 binucleate cell population during late gestation. **Placenta**, v. 23, p. 451-458, 2002.
- 322 WARD, J. W.; WOODING, F. B. P.; FOWDEN, A. L. The effects of cortisol on the
323 binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. **Placenta**, v. 23, p.
324 451-458, 2002.

- 325 WANGO, E. O; WOODING, F. B. P. The role of trophoblastic binucleate cells in
326 implantation in the goat: a morphological study. **Journal of Anatomy**, v. 171, p. 241-
327 257, 1990.
- 328 WANGO, E. O; HEAP, R. B; WOODING, F. B. P. Progesterone and 5β -pregnanediol
329 production by isolated fetal binucleate cells from sheep and goats. **Journal of**
330 **Endocrinology**, v. 129, p. 283-289, 1991.
- 331 WEENS, Y. S.; BRIDGES, P. J.; LEAMASTER, B.G.; CHING. L.; WEENS, C. W.
332 Effect of the aromatase inhibitor CGS-16946A on pregnancy and secretion of
333 progesterone, estradiol- 17β , prostaglandins E and $F2\alpha$ (PGE; PGF 2α) and pregnancy
334 protein (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes. **Prostaglandins and other lipid**
335 **mediators**, v. 66, p. 77-88, 2001.
- 336 WOODING, F. B. P. The synepitheliocorial placenta of ruminants: binucleate cell
337 fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 101-113, 1992.
- 338 WOODING, F. B. P.; HOBBS, T.; MORGAN, G.; HEAP, R. B.; FLINT, A. P. F. Cellular
339 dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: na autoradiografic
340 study. **Journal of reproduction and fertility**, v. 98, p. 275-283, 1993.
- 341 WOODING, F. B. P. Analysis of the estructure of the ruminant placenta. **Placenta and**
342 **Trophoblast Methods and Protocols**, v. 1, p. 315-322, 2006.
- 343 WOODING, F. B. P; CHAMBERS, S. G; PERRY, J. S; GEORGE, M; HEAP, A. R. C.
344 Migration of binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy. **Anatomy**
345 **and Embryology**, v. 158, p. 361-370, 1980.
- 346 WOODING, F. B. P; WATHES, C. D. Binucleate cell migration in the bovine
347 placentome. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 425-430, 1990.
- 348 WOODING, F. B. P. Role binucleate cells in fetomaternal cells fusion at implantation in
349 the sheep. **American Journal Anatomy**, v. 170, p. 233-250, 1984.

ANEXOS

Anexo 1. Atestado do comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto que o Projeto de Pesquisa "Análise morfológica de placentônios de ovelhas da raça Santa Inês oriundos de cordeiros nascidos de transferências de embriões" **Protocolo CEUA 140/2014**, aprovado em 05/09/2014, a ser conduzido por **Josiane Adelaide Camargo Lourenção**, para fins de pesquisa científica; teve o título alterado para: "Imunoexpressão de estrógenos alfa (ER α), beta (ER β) e progesterona (PR) em cotilédones fetais de cordeiros obtidos via transferência de embriões", e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	10/09/2014 a 01/08/2016
Espécie/Linhagem	Ovina/ <i>Ovis aries</i>
Nº de animais	18
Peso/Idade	50 Kg/Variável
Sexo	Variável
Origem	Universidade Estadual de Maringá

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 06/06/2016

Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n

UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681

☐ (14) 3880-2176 – ☐ patrizia@fmvz.unesp.br – ☐ www.fmvz.unesp.br

Anexo 2. Protocolos de histoquímica e colorações específicas utilizados no experimento

TRICÔMICO DE MASSON

SOLUÇÃO DE BOUIN

Solução saturada de Ácido Pícrico	75 ml
Formaldeído puro	25 ml
Ácido Acético Glacial	5 ml

HEMATOXILINA FÉRRICA DE WEIGERT

Solução A

Hematoxilina pó	1 g
Álcool 95%	100 ml

Solução B

Solução aquosa de Cloreto Férrico a 29%	4 ml
Água destilada	95 ml
Ácido Clorídrico Concentrado	1 ml
Solução de trabalho: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B	

SOLUÇÃO DE ESCARLATE DE BIEBRICH

Solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1%	90 ml
Solução aquosa de Fucsina Ácida 1%	10 ml
Ácido Acético Glacial	1 ml

SOLUÇÃO ÁCIDA FOSFOTÚNGSTICA-FOSFOMOLÍBDICA

Ácido Fosfotúngstico	2,5 g
Ácido Fosfomolíbico	2,5 g
Água destilada	100 ml

SOLUÇÃO DE AZUL DE ANILINA

Azul de Anilina	2,5 g
Ácido Acético Glacial	2 ml
Água destilada	100 ml

SOLUÇÃO DE ÁGUA-ÁCIDO

Água destilada	100 ml
Ácido Acético Glacial	1 ml

PROCEDIMENTO:

1. Desparafinar e hidratar

2. Lavar em água corrente por 5 minutos
3. Mordentar em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente
4. Lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin
5. Passe em água destilada
6. Core pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos
7. Lavar em água corrente por 10 minutos
8. Passe em água destilada
9. Corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos
10. Passe por água destilada
11. Diferencie pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos
12. Passe por água destilada
13. Corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos
14. Lave em água destilada
15. Passe pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos
16. Passe por água destilada
17. Desidrate, diafanize e monte em resina.

PAS--ÁCIDO PERIÓDICO + REATIVO DE SCHIFF

SOLUÇÃO CORANTE: REATIVO DE SCHIFF

Aquecer 200 ml de água destilada em um erlenmeyer de 500 ml até a ebulição. Adicionar 1 g de Fucsina Básica (MERCK, granulada) cuidadosamente adicionando pouco a pouco, evitando a reação térmica, deixar abaixar a temperatura em 60 C aproximadamente e filtrar AGITANDO SEMPRE até que a temperatura abaixe à do ambiente. Adicione 20 ml de Ácido Clorídrico 1N *

Água destilada. 92 ml
 Ácido Clorídrico. 8 ml
 Adicione também 1 g de Metabissulfito de Sódio
 Continuar agitando por mais 3 horas e deixar em repouso durante a noite.
 Adicionar 1 g de carvão ativado. Agite por 1 hora, filtre o corante e estoque em geladeira.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO PERIÓDICO 0,5%

Cristais de Ácido Periódico	0,5 g
Água destilada	100 ml

PROCEDIMENTO

1. Desparafinar e hidratar
2. Oxidar em Ácido Periódico 0,5% por 15 minutos
3. Lavar em água corrente por 5 minutos e enxaguar na água destilada por 3 vezes
4. Corar em Reativo de Schiff por 30 minutos
5. Lavar em água corrente por 5 minutos
6. Contra corar pela Hematoxilina de Harris por 5 segundos
7. Lavar em água corrente por 5 minutos

8. Desidratar, diafanizar e montar em resina

MÉTODO DE VON KOSSA PARA CÁLCIO

FIXAÇÃO: Formol 10% ou preferencialmente em Álcool,
Cortes 4 µm

Solução de NITRATO DE PRATA 5%

Nitrato de Prata.....5 g

Água destilada.....100 ml

Solução TIOSULFATO DE SÓDIO 5%

tiosulfato de Sódio.....5 g

Água destilada.....100 ml

Solução de SAFRANINA

Safranina.....0,1 g

Ácido Acético Glacial.....1 ml

Água destilada.....99 ml

PROCEDIMENTO:

1. Desparafinar, hidratar
2. Passar por 3 vezes em água destilada
3. Gotejar sobre o corte na lâmina o Nitrato de Prata e submeta a luz solar por 30 minutos a 1 hora ou luz ultra violeta ou ainda a uma lâmpada de 100 watts
4. Enxaguar em água destilada
5. Passar em tiosulfato de Sódio 5%
6. Lavar em água destilada por 3 vezes
7. Contra corar os núcleos pela Safranina por 5 minutos
8. Desidratar, diafanizar e montar

AZUL DE TOLUIDINA

Fixação: Formalina a 10%

Cortes em parafina de 4 mm

AZUL DE TOLUIDINA

Azul de Toluidina.....0,1 g

Água destilada.....100 ml

Procedimento:

1. Desparafanizar e hidratar
2. Corar com o Azul de toluidina por 2 minutos
3. Enxaguar com água destilada
4. Secar a estufa a 56°C
5. Montar.

Anexo 2. Normas para publicação na revista Animal Reproduction Science

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan
University of Melbourne
Veterinary Clinical Centre
250 Princess Highway
VIC 3030 Werribee, Australia
k.macmillan@unimelb.edu.au

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other

funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative

works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/evise/jrnl/ANIREP>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

**Preparation****Article structure**

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family

name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly

established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number

consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no

additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-reproduction-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also

make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).