

Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (*Bos indicus* -Linnaeus, 1758)

*Behavior of binucleate giant cells in Nelore cow placenta (*Bos indicus* - Linnaeus, 1758)*

Luciano de Moraes Pinto, Carlos Eduardo Ambrósio¹, Dulcinéia Gonçalves Teixeira, Karla Patrícia Cardoso Araújo, José Roberto Kfoury Júnior, João Carlos Morini Junior, Adriana Caroprezo Morini, Rose Eli Grassi Ricci, Guilherme José Bolzani de Campos Ferreira, Daniele dos Santos Martins, Maria Angélica Miglino

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia,
Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

¹Correspondência: ceambrosio@usp.br.

Resumo

Nas últimas duas décadas, a placenta bovina vem sendo intensamente estudada e com isto, novas classificações e conceitos são aplicados na Medicina Veterinária Mundial. Uma população de células ímpares da placenta de ruminantes, as células trofoblásticas gigantes (CTGs), intriga pesquisadores e profissionais veterinários. A origem dessas células parece ser uma manifestação evolucionária rumo à formação de placentas decíduas ou, o contrário, passando de uma condição de decídua para não decídua sinepteliocorial mais especializada. Com vistas às especializações celulares placentárias, as células trofoblásticas gigantes foram analisadas em relação aos seus aspectos histológicos e ultra-estruturais durante a gestação em 11 vacas especificamente da raça Nelore, objetivando o seu entendimento morfofisiológico e comportamento durante o parto e suas relações com a retenção placentária. Ao atingir a maturação, as CTGs iniciam o processo de migração em direção ao epitélio uterino, que pode ocorrer com ou sem fusão de tais células com as desse epitélio. As células trofoblásticas gigantes estão presentes no epitélio trofoectodérmico desde a implantação até o parto. Verificou-se que essas células aparecem no trofoblasto em quantidades que diminuem ao longo da gestação, especialmente após 150 dias. Os grânulos em seu citoplasma encerram em seu interior produtos secretores tais como proteínas e lipídios (pacotes de armazenamento de triglicérides). A partir do segundo trimestre de gestação, é possível encontrar algumas células trofoblásticas gigantes muito próximas a capilares sangüíneos. Na microscopia de luz, a degranulação é evidente e é possível observar a passagem dos grânulos em direção ao epitélio uterino que está ancorado próximo da rede capilar materna. A diminuição das células maternas, incluindo as células trofoblásticas gigantes nas criptas uterinas, é importante para a liberação das membranas fetais em vacas zebuínas. Aparentemente, se não houver declínio dessas células, o processo de liberação da placenta fica comprometido, porém, baseado na discrepância entre estes resultados (fundamentados nos de William *et al.*, 1987) e os resultados de outras espécies de ruminantes (ovinos e bubalinos), este fato parece não ocorrer. A maior quantidade de células trofoblásticas gigantes no início da gestação, especificamente no período de pós-implantação, é relevante para a manutenção da gestação, porque elas produzem, dentre outros hormônios, a progesterona, um reconhecido e eficiente mantenedor de anestro. A diminuição, ao que parece, acontece porque sua função endócrina, mais importante no início do que no final da gestação, já foi cumprida. Observou-se que, na vaca Nelore, a diminuição do número de células trofoblásticas gigantes pode ocorrer pela sua fusão com células do epitélio uterino, formando células trofoblásticas gigantes de três núcleos, ou por processo apoptótico normal. E finalmente foi confirmado que a formação dessas células constitui manifestação evolucionária placentária da condição de decídua para não decídua do tipo sinepteliocorial mais especializada.

Palavras-chave: placenta, trofoblasto, Nelore, célula trofoblástica gigante.

Abstract

In the last two decades, bovine placenta has been intensely studied and new classifications and definitions are applicable in all World Veterinary Medicine. An unique cell population of ruminant placenta, the trophoblastic giant cells (TGCs), allures researchers and veterinary practioners. The cell origin seems to be an evolutionary manifestation going to decidua placenta formation or, in contrast, changing from a decidua feature to more specialized synepitheliochorial non-decidua. Aiming to understand better placental cell specialization, histological and ultrastructural features of trophoblastic giant cells were analyzed trying to explain morphophysiological and behavior changes. The analysis period was done during 11 pregnancies of Nelore cows and at parturition associated (or not) with placental retention. When the placenta reached the maturation, trophoblastic giant cells s started to migrate in the direction of the uterine epithelium. It has been observed that fusion of these cells to the epithelium cells occasionally occurred. Trophoblastic giant cells s were found in the trophoctoderm epithelium from implantation up to parturition. It was verified that these cells appeared in the trophoblast in a given quantity that decreased during the gestation, particularly after 150 days of gestation.

*Inside the cytoplasm granules secretion products like proteins or lipids (triglycerides packs) were observed. From the second trimester of pregnancy on it was possible to find trophoblastic giant cells close to the capillary vessels net. Using light microscopy degranulation was evident and it was possible to see the granules migrating in the direction of the uterine epithelium which is ancorage close to the maternal vessels. The decrease of maternal cells in the uterine crypts, including trophoblastic giant cells is important to fetal membranes detachment in zebu cows. Apparently, if there is no decline of these cells, the placental release is compromised. However, based on the discrepancy of our results (supported by those of William *et al.*, 1987) and results found in other ruminant species (sheep and buffalos), this decline seems not to occur. The great amount of trophoblastic giant cells in the beginning of pregnancy, specifically after implantation is important to the gestation maintenance. This because those cells produces, among other hormones, progesterone, a recognized and efficient anestrus regulator. The decrease of trophoblastic giant cells along the pregnancy seems to occur because its endocrine function is more important in the beginning than at the end of pregnancy. It was observed that in Nelore cows, the decrease of trophoblastic giant cells number can happen either by the fusion of them with the uterine epithelium cells, originating trophoblastic giant cells with three nuclei, or by a normal apoptotic process. Finally, it was confirmed that these cells formation is an evolutionary manifestation related from decidua to non-decidua specialized synepitheliochorial placenta.*

Keywords: placenta, trophoblast, Nelore, trophoblastic giant cells.

Introdução

A placenta de ruminantes restringe-se a numerosas unidades de tamanhos e formatos muito variados (placentônios), que consistem de um tufo de vilosidades fetais (cotilédones) interdigitadas com invaginações criptiformes reunidas no útero (carúnculas uterinas). Integrando esta união está o trofoblasto, representado por uma única camada de células que recobrem as vilosidades fetais (córion fetal; Amoroso, 1961; Hradeckey *et al.*, 1988).

Os estudos pioneiros de Assheton (1906), sobre a formação da placenta de ovelhas, subsidiaram estudos subseqüentes sobre as membranas fetais de outras espécies de ruminantes. Segundo o autor, a implantação e formação do placentônio estão diretamente envolvidas com a atividade das células trofoblásticas gigantes (CTGs).

Este trabalho objetiva conhecer os aspectos histológicos do trofoblasto de bovinos da raça Nelore, com idade gestacional entre 60 e 240 dias, caracterizar morfologicamente as células trofoblásticas gigantes, descrever o comportamento da população de células do epitélio nas criptas das carúnculas uterinas e observar se a diminuição das células trofoblásticas gigantes ao longo da gestação tem relação com a retenção placentária.

As células trofoblásticas gigantes

As primeiras Células trofoblásticas gigantes, também conhecidas como células binucleadas, estão localizadas entre as células trofoblásticas adjacentes e, inicialmente, não estabelecem nenhuma conexão com a lâmina basal e nem compartilham dos complexos de junção apical do epitélio uterino. Aparecem primeiramente na parede do blastocisto pré-implantado, invadem o endométrio em torno do 22º dia, sendo continuamente produzidas ao longo da gestação, quando constituem 15 a 22% da celularidade trofoblástica normal (Wooding e Wathes, 1980; Hansel *et al.*, 1989; Igwebuike, 2004). Esta afirmação é comprovada pelo uso subseqüente das técnicas de radioautografia e imunohistoquímica (Wooding, *et al.*, 1996). As células trofoblásticas gigantes mostram características estruturais semelhantes às células trofoblásticas, como margens ciliadas e acúmulo de gotículas de lipídios na região do córion.

As células trofoblásticas gigantes de ruminantes representam papel central, formando as estruturas e as secreções da interface materno-fetal, sendo de suma importância no estabelecimento e na manutenção da gestação (Wathes e Wooding, 1981; Wooding e Staples, 1981). A fusão das células trofoblásticas gigantes com o tecido epitelial uterino, de acordo com Wooding *et al.* (1982), parece estar relacionada com o reconhecimento materno-fetal, evitando ataque dos linfócitos maternos às estruturas fetais.

Winsatt (1980) afirma que as células trofoblásticas gigantes de ruminantes, comumente chamadas de diplocariócitos, são maiores que células trofoblásticas adjacentes e contêm pares de núcleos diplóides, possuem formato arredondado, aumentam de tamanho e começam a desenvolver aspectos citoplasmáticos que distinguem seu estado de maturação, inclusive os grânulos citoplasmáticos característicos.

De acordo com Greenstein *et al.* (1958) e Björkman (1968), em bovinos, as células trofoblásticas gigantes não são derivadas de nenhuma linhagem celular específica, começam a aparecer no epitélio coriônico aos dezessete dias de gestação, onde permanecem até o final de todo o período gestacional. Wooding *et al.* (1982) complementam que elas se originam a partir das células trofoblásticas fetais, da diferenciação do trofoblasto cilíndrico, ou ainda de células precursoras comuns por meio de cariocinese sem citocinese acompanhante. Acredita-se que as células trofoblásticas gigantes originam-se de células trofoblásticas através de

endoduplicação (mitoses incompletas; Klisch *et al.*, 1999).

Para Flood (1991), as células trofoblásticas gigantes em bovinos constituem aproximadamente 10% das células trofoblásticas, entre os dias 18 e 20 da gestação, e 20% nos períodos subseqüentes. Somente 20% dessas células têm capacidade de migração, as quais se fundem a outras células epiteliais, constituindo 50% do epitélio materno no 24º dia de gestação.

As células trofoblásticas gigantes binucleadas parecem enviar projeções citoplasmáticas em direção e através do epitélio uterino, mostrando sinais de apoptose e degeneração celular, tais como vascularização e fragmentação do núcleo e citoplasma. Estes achados são consistentes com a hipótese de que tais células migram em direção ao epitélio uterino para liberar os produtos de seus grânulos na circulação materna, degenerando-se subseqüentemente (Duello *et al.*, 1986).

Histologia das células trofoblásticas gigantes

Ao examinar os placentônios de vacas Nelore em diferentes estados de prenhez por microscopia de luz, foram notadas interdigitações seccionadas em posição longitudinal, transversal e oblíqua, segundo o plano de corte. Nestes campos, foi possível distinguir várias células trofoblásticas e células trofoblásticas gigantes, contendo dois núcleos ordenados em dois extratos intimamente ancorados um no outro devido a uma extensa linha de microvilosidades. Tais elementos celulares, somados ao mesênquima e aos vasos sanguíneos que ocupam o centro do vilo, compõem a junção materno-fetal, de configuração muito semelhante à relação de um dedo com luva. Representando o dedo, tem-se a vilosidade fetal, circundada perifericamente por células trofoectodérmicas fetais com um ou dois núcleos. A luva, por sua vez, é constituída por epitélio uterino formado por células de morfologia variada.

Pelo método do tricrômio de Masson, pôde-se evidenciar o epitélio caruncular uterino repousando em uma lâmina basal bem delimitada. Entre a lâmina basal do epitélio uterino e o estroma endometrial, observou-se grande quantidade de capilares sanguíneos maternos. O estroma endometrial está composto por fibroblastos típicos entremeados por abundante matriz extracelular onde prevalecem fibras colágenas. As células epiteliais uterinas cuboidais em sua maioria têm seus núcleos corados em vermelho intenso, enquanto as células trofoblásticas gigantes são coradas em vermelho claro, e o seu citoplasma em azul.

Em histoquímica, por meio do método de P.A.S., evidenciou-se o estroma endometrial pela afinidade desse corante com proteoglicanas e aminoglicanas. A maior quantidade de fibras reticulares também é responsável pela reação mais intensa nessa região do que no mesênquima fetal, uma vez que esta se apresenta normalmente pobre nesse elemento; grandes quantidades de fibroblastos podem ser observadas por essa técnica. As células trofoblásticas gigantes apresentam citoplasma granulado em virtude da afinidade entre o reagente de Schiff e as substâncias glicoprotéicas presentes em abundância no seu citoplasma; as lâminas basais trofoblásticas e do epitélio uterino se mostram mais evidentes nessa preparação.

Em ambos os casos, o epitélio caruncular uterino mostrou-se contínuo, formado integralmente por células com um único núcleo. Não foram observadas qualquer migração celular nem fusão entre as células do epitélio trofoblástico fetal e as células do epitélio caruncular uterino.

Diferenciação e migração das células trofoblásticas gigantes ao longo da gestação

O citotrofoblasto é caracterizado a partir do 80º dia de gestação, e grandes quantidades de células trofoblásticas gigantes são evidenciadas na periferia do vilo em íntimo contato com o epitélio caruncular uterino. Seus núcleos apresentam tamanhos diferentes em detrimento do ângulo de secção do tecido e a posição tridimensional no citoplasma celular. As células trofoblásticas fetais são mal definidas e dispersas, e alguns fibroblastos e poucos capilares são encontrados no mesênquima, o que confirma a evolução da vascularização em fases mais tardias da gestação.

Grânulos de tamanhos variados, distribuídos aleatoriamente no citoplasma, cujos diâmetros muitas vezes rivalizam com o próprio núcleo celular, provavelmente de natureza lipídica, podem ser observados em menor número nas células trofoblásticas fetais e em grande quantidade nas células do epitélio caruncular uterino.

A fusão de algumas células epiteliais uterinas é um evento comum em placenta de bovinos; foram encontradas células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos, e o número de núcleos está relacionado com o número de células envolvidas nesse processo.

Dos 60 aos 120 dias de gestação, as células trofoblásticas gigantes são abundantes e posicionam-se junto à linha de junção materno-fetal. Dos 90 aos 240 dias, pode-se notar um aumento considerável da vascularização e uma diminuição destas células, sem interromper seu processo de formação, indicando o início do processo degenerativo. Em torno de 150 dias, esse processo se intensifica: a cromatina começa a se condensar, tornando o núcleo cada vez mais picnótico; o citoplasma reduz o seu volume e perde seu aspecto granular e a membrana plasmática também tem seu contorno alterado (Fig. 1A, 1B, 1C e 4).

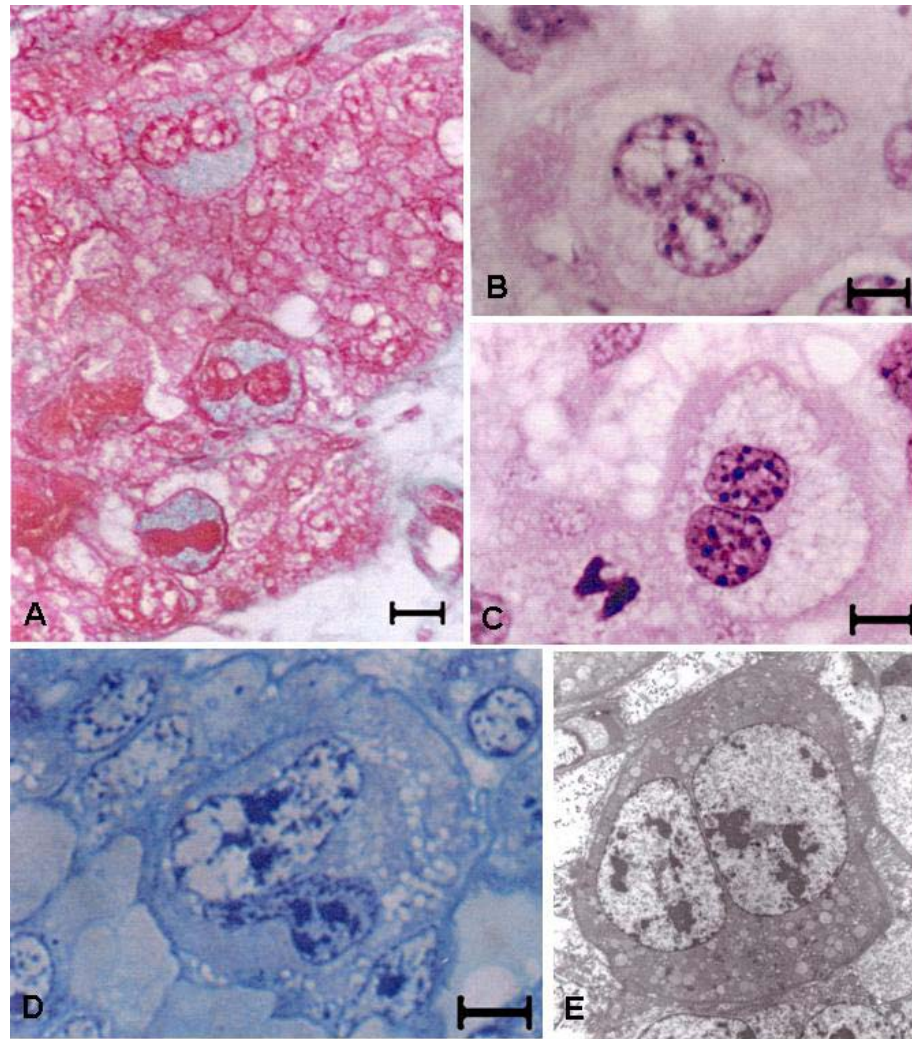


Figura 1A, B, C e D. Fotomicrografia de corte histológico de placenta de bovino da raça Nelore evidenciando o processo de fusão e formação da célula trofoblástica gigante. **A**- Processo degenerativo da célula binucleada; **B**- Núcleos picnóticos; **C**- Perda de contorno das membranas nucleares e citoplasmática, acompanhada de redução das matrizes celular e citoplasmática; **D**- Processo de cariocinese; **E**- Eletromicrografia de transmissão evidenciando núcleos ovóides de célula madura, **A**- tricômio de Masson, **B e C**- Hematoxilina-eosina, **D**- Azul de Toluidina, Barra: 10 μ m. **E**- 2500x.

Dos 150 aos 210 dias, as células trofoblásticas gigantes começam a se fusionar com o epitélio uterino ou com as células trofoblásticas fetais, aparecendo com maior frequência aos 240 dias de gestação, e o desenvolvimento capilar nesse período é bastante acentuado, ocupando quase todo o espaço mesenquimal do vilão fetal (Fig. 4).

Amoroso (1961), em observações ao microscópio de luz, embasou e estendeu as sugestões de Assheton (1906), concluindo que, em ovelhas, as células trofoblásticas gigantes migram do epitélio trofoectodérmico para realizar fagocitose e remover a camada epitelial nas carúnculas uterinas. Em placentônios de vacas, as células trofoblásticas gigantes também migram, mas, para uma camada celular que cobre as criptas das carúnculas maternas, porém, nenhum sinal de fagocitose do epitélio uterino foi encontrado.

A diferenciação das células trofoblásticas gigantes situadas no mesênquima inicia-se no trofoectoderma fetal; à medida que amadurecem se aproximam da linha de junção entre a superfície interdigitada com as células epiteliais uterinas, e as mais diferenciadas permanecem nesse local. Começam duplicando seu núcleo (cariocinese) sem duplicação do citoplasma (citocinese), sendo que o núcleo “filho” tem a metade do tamanho do núcleo “mãe” (Fig. 1D). Em seguida, os núcleos assumem a posição central no citoplasma celular, mantendo-se paralelos um ao outro (Fig. 1E). O volume citoplasmático, inicialmente pequeno, aumenta à medida que se multiplica o número de grânulos (Fig. 2A, 2B).

As células trofoblásticas gigantes maduras e granuladas (Fig. 2C) permanecem muito próximas ao topo

do epitélio uterino. Os núcleos são esféricos ou ovóides em células jovens, no entanto mostram-se sempre ovóides em células maduras. A membrana nuclear é bem definida, e a cromatina está dispersa e arranjada em numerosas aglomerações (Fig. 2D). Nucléolos não são bem caracterizados, parecendo estar ausentes na célula jovem, mas mostram-se evidentes na célula madura, podendo variar em número de dois a quatro.

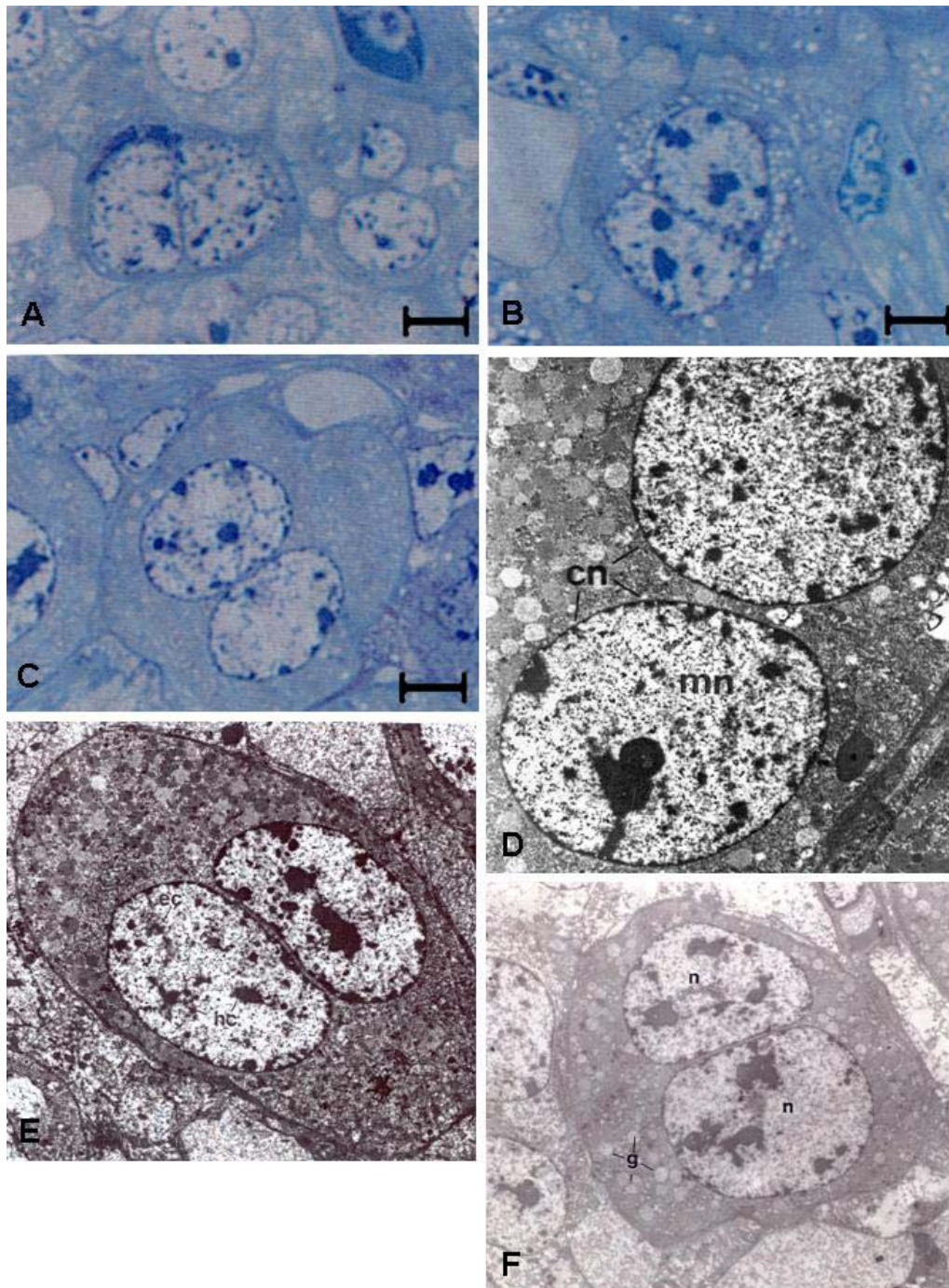


Figura 2A, B e C. Fotomicrografia de corte histológico de placenta de bovino da raça Nelore. **A**- Pequeno volume citoplasmático; **B**- Aumento progressivo do citoplasma em virtude da multiplicação dos grânulos; **C**- Célula madura com citoplasma abundante; **D**, **E** e **F**- Eletromicrografia de transmissão de células trofoblásticas gigantes, **D**- Núcleos esféricos de célula jovem, (**cn**) cápsula nuclear delimitada, (**mn**) matriz nuclear; **E**- (**hc**) heterocromatina condensada e a (**ec**) eucromatina finamente dispersa; **F**- (**n**) núcleos de diferentes tamanhos; (**g**) grânulos de diferentes tamanhos dispersos no citoplasma celular. **A**, **B** e **C**- Azul de Toluidina, Barra: 10 μ m; **D**- 2500x; **E** e **F**- 4000x.

De acordo com o ângulo de secção do tecido, podem-se ter núcleos de tamanhos diferentes ou apenas um núcleo evidente. É possível que essas diferenças sejam decorrentes da localização espacial assumida por

essas estruturas no interior do citoplasma celular.

A cromatina contida no interior do envelope nuclear pode ser de dois tipos: a heterocromatina metabolicamente inerte cora-se intensamente à microscopia de luz e é fortemente eletrodensa à microscopia eletrônica de transmissão; a eucromatina, por sua vez, cora-se fracamente, está dispersa e representa a forma metabolicamente ativa do DNA. A variação da proporção entre a heterocromatina e a eucromatina altera a aparência do núcleo. Este pode variar de condensamento (muita heterocromatina), o que acontece com núcleos de células em degeneração, aberto ou vesicular (pouca heterocromatina). É muito útil este padrão na identificação do grau de maturação das células trofoblásticas gigantes (Fig. 1E, 2D, 2E). Em todas as células observadas, os núcleos estavam sempre centralizados, não sendo observado nenhum núcleo paracentral ou excêntrico.

Os grânulos de aspecto heterogêneo com diferentes tamanhos e eletrodensidades, sem distinção da polaridade celular em qualquer fase do ciclo de maturação celular, estão dispersos aleatoriamente no citoplasma das células trofoblásticas gigantes e encerram em seu interior produtos secretores tais como proteínas e lipídios (pacotes de armazenamento de triglicérides). Algumas características morfológicas e ultra-estruturais desses produtos são bem definidas e muito importantes para diferenciação dos grânulos.

Os lipídios, ao microscópio eletrônico, aparecem como corpos osmiofílicos de densidade variável e reduzidos no citoplasma (Fig. 2E). O grau de escurecimento da coloração (capacitação do ósmio) é uma função da composição lipídica da gotícula. Seu contorno é irregular e, embora pareçam ser revestidas por membrana, na realidade, elas estão livres no citoplasma. Antes do 150º dia de gestação, foram identificados grânulos de lipídios nas células epiteliais das criptas uterinas, sendo que as células trofoblásticas gigantes formam a “linha de frente” no contato com o epitélio uterino, sugerindo que essa possa ser uma das vias de transferência de lipídios para o feto. Estes achados corroboram com Duello *et al.* (1986) de que as células trofoblásticas gigantes migram em direção ao epitélio uterino para liberar os produtos de seus grânulos na circulação materna.

As inclusões citoplasmáticas cinza-claro (baixa captação de ósmio) formam outro grupo de grânulos secretores (Fig. 3A), com conteúdo geralmente protéico ou glicoprotéico, abundante na CTG madura. Ao exame da ultra-estrutura é possível identificar uma cápsula provavelmente derivada do complexo de Golgi (Fig. 3B) que encerra o conteúdo granular (glicoprotéico) com reação fortemente positiva para P.A.S.

A partir do segundo trimestre de gestação, é possível encontrar algumas células trofoblásticas gigantes muito próximas a capilares sanguíneos. Verifica-se que essas membranas (celular e endotelial) estão separadas por uma projeção da membrana plasmática de uma célula mesenquimal circunvizinha (Fig. 3C, 3D e 3E), impedindo, assim, o contato direto entre essas estruturas.

As células trofoblásticas gigantes estão presentes no epitélio trofoectodérmico desde a implantação até o parto. Investigações em microscópio de luz indicam que essas células migram pela junção materno-fetal, mas, em observações ao microscópio eletrônico de transmissão, não foram encontradas evidências desse evento. Ao interromper a linha de junção microvilosa, a célula trofoblástica gigante recém-migrada estabelece contato íntimo com a lâmina basal do estroma endometrial. Quando a migração ocorre pela fusão entre uma célula trofoblástica gigante fetal e uma célula epitelial caruncular uterina, tem-se a formação de uma célula trofoblástica gigante com três núcleos. Após a fusão, o terceiro núcleo apresenta tamanho diferente dos outros dois, sendo que a heterocromatina está mais condensada e os nucléolos são mais evidentes.

Um parâmetro diferencial entre as células trofoblásticas gigantes fetais e aquelas que se formam por meio da fusão de uma célula trofoblástica gigante fetal e uma célula materna é que os três núcleos são sempre do mesmo tamanho e a distribuição da cromatina obedece ao mesmo padrão em ambos os núcleos (Fig. 3F). Nas células trofoblásticas gigantes fetais, os grânulos citoplasmáticos estão concentrados em um dos pólos celulares, e essa polaridade torna-se invertida quando essa célula começa a interromper a camada de células epiteliais uterinas.

Todos os eventos para surgimento de células trofoblásticas gigantes observados na placenta de vacas Nelore aconteceram com cariocinese sem citocinese. Não foram verificadas outras modalidades de surgimento como assinalaram Björkman (1968) e Wooding *et al.* (1982).

Os “diplocariócitos” observados por Winsatt (1980) na ovelha correspondem às células trofoblásticas gigantes da vaca. No entanto, não se observa nessa espécie a diferença de textura, de composição química (reação a diferentes colorações) ou de distribuição de organelas como foi descrito na ovelha e na búfala (Carvalho *et al.*, 2006).

O ciclo de formação e degeneração das células trofoblásticas gigantes se processa durante toda a gestação com maior ou menor intensidade, sem interferir no processo degenerativo da célula, confirmando os achados de Carvalho *et al.* (2006).

Na microscopia de luz, a degranulação é evidente e é possível observar a passagem dos grânulos em direção ao epitélio uterino que está ancorado próximo da rede capilar materna. As células do epitélio uterino se acomodam a essa “nova” configuração epitelial sem perder seu contorno citoplasmático e nem seu aspecto granular característico.

Concluído o processo migratório, as células estacionam no limite da lâmina basal e nenhum elemento celular binucleado ou trinucleado foi observado além dessa barreira. Também não se observou nenhuma célula

epitelial uterina em contato estreito com capilares sanguíneos maternos.

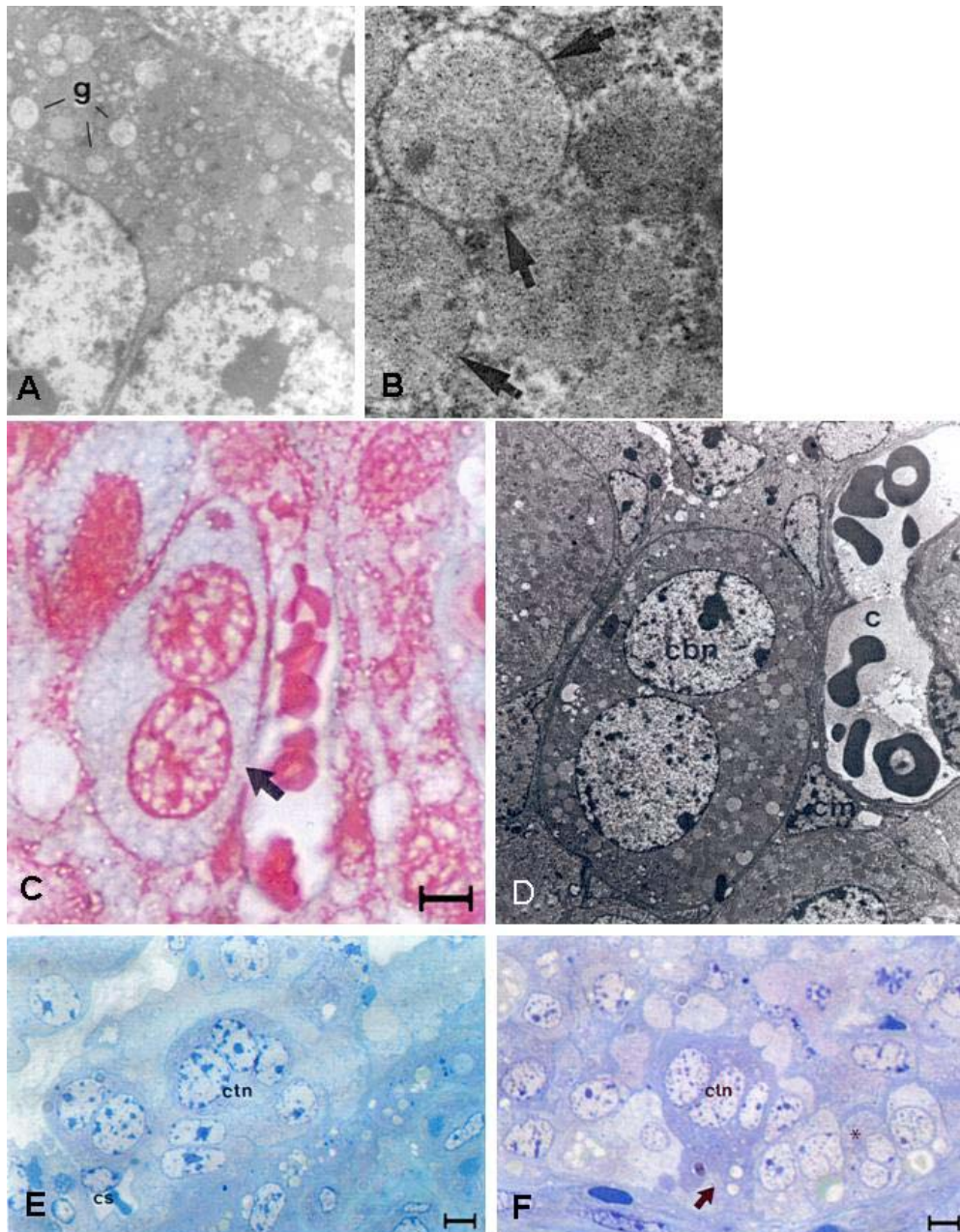
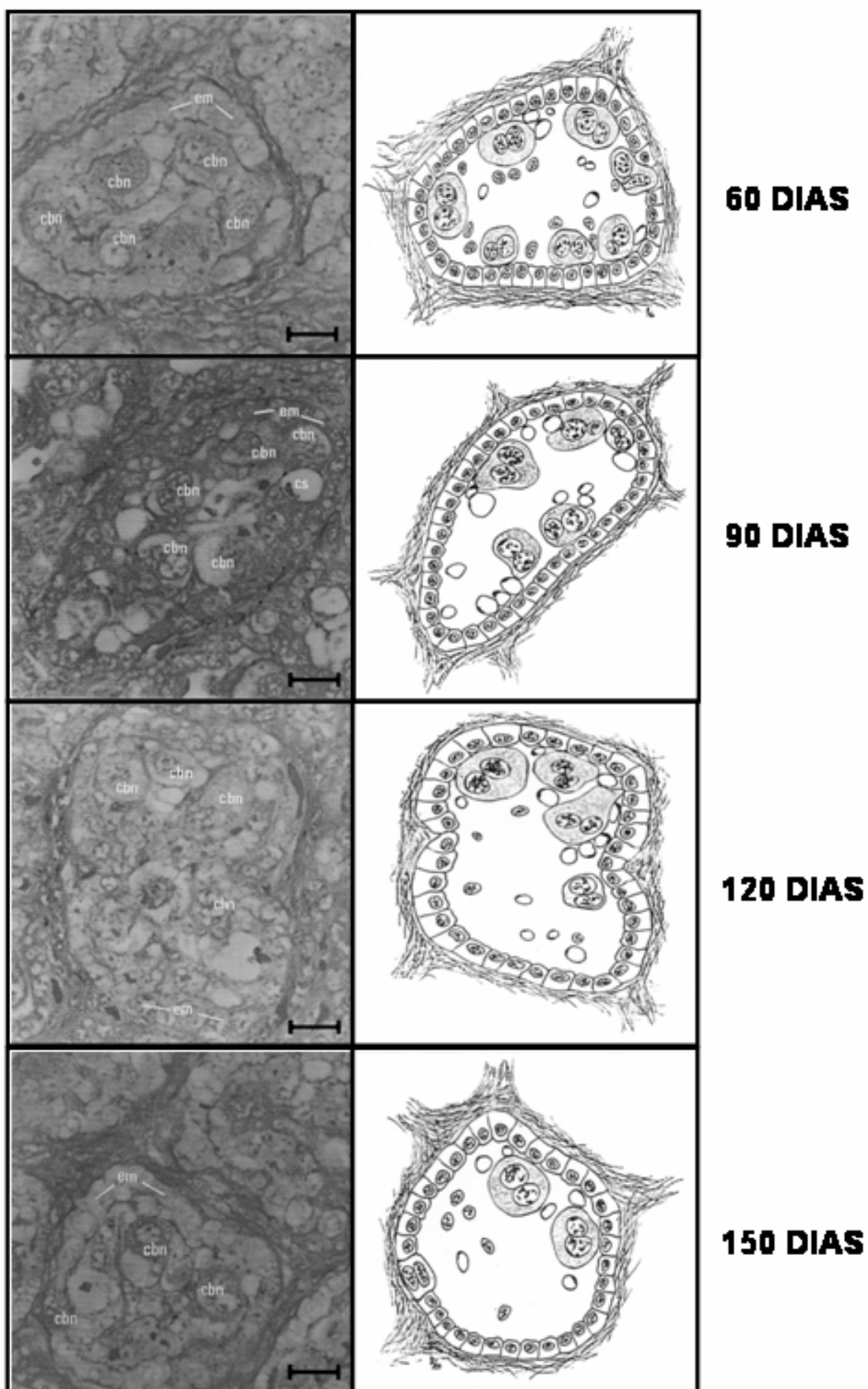


Figura 3A e B. Eletromicrografia de transmissão de células trofoblásticas gigantes; **A-** (**g**) grânulos de diferentes tamanhos dispersos no citoplasma celular; **B-** (**seta**) cápsula que envolve os grânulos; **C-** Fotomicrografia de corte histológico da placenta de bovino da raça Nelore, 150 dias de gestação. (**seta**) comunicação entre a CTG e o capilar sanguíneo; **D-** Eletromicrografia de transmissão de (**cbn**) célula binucleada em proximidade com o endotélio capilar; projeção da membrana plasmática de uma (**cm**) célula mesenquimal interposta entre o (**c**) capilar e a (**cbn**) célula binucleada. **E e F-** Fotomicrografia 210 dias de gestação. Fusão entre a célula binucleada (CTG) e célula trofoblástica fetal formando uma célula trofoblástica gigante com três núcleos (**ctn**) célula trinucleada; **C-** (**cbn**) célula binucleada próximo a um (**cs**) capilar sanguíneo fetal; **D-** (**ctn**) interpondo-se entre as células epiteliais da carúncula uterina lançando seu conteúdo granular (**seta**). (*) célula epitelial uterina binucleada. **A-** 4000x; **B-** 3500x; **C-** tricômio de Masson, Barra: 10 μ m; **D-** 4000x; **E e F-** Azul de Toluidina, Barra: 10 μ m.



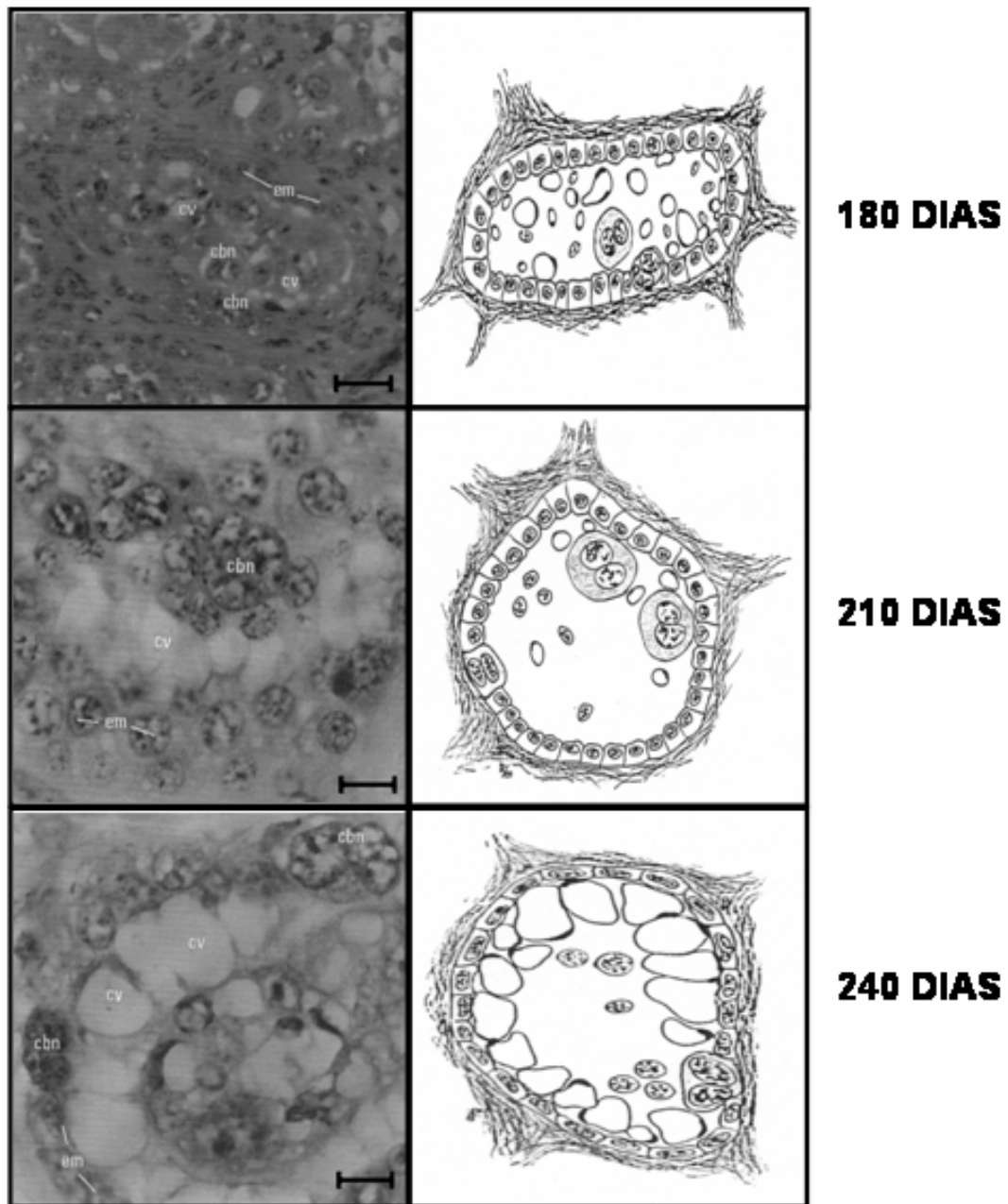


Figura 4. Representação esquemática do trofoblasto de bovinos da raça Nelore. Aspectos do trofoblasto dos 60 aos 240 dias de gestação. A vascularização capilar na junção materno-fetal desenvolve-se concomitantemente atingindo o máximo no final da gestação. A migração das Células trofoblásticas gigantes inicia-se aos 180 dias e persiste até aos 240 dias. As células que ainda não se degeneraram já se encontram entre as células epiteliais uterinas. **Cbn** – célula binucleada; **em** – epitélio materno; **cs** – capilar sanguíneo; **ev** – endotélio dos vasos. Barra: 100 μ m.

Retenção de placenta x Células trofoblásticas gigantes

Os baixos índices de retenção da placenta verificados em vacas zebuínas, assinalados por Pandit *et al.* (1981), Verma e Isha (1984), Roberts (1986) e Wagner (1989), confirmam que os animais zebuínos são mais resistentes a essa intercorrência do puerpério. De modo geral, foi observada diminuição de número de células maternas nas criptas das carúnculas uterinas conforme apontaram Grunert (1986), Woicke *et al.* (1986), Marques Júnior (1988), Barreto Filho (1992) e Barreto Filho e Marques Júnior (1993). Certamente, se se forem analisadas essas amostras sob a luz da estereologia, podem-se obter resultados semelhantes aos já encontrados pelos autores citados.

Entre as criptas do epitélio uterino e as vilosidades placentárias, encontram-se normalmente algumas

células trofoblásticas contendo dois ou três núcleos intimamente dispostos e pouco citoplasma associado. Essas células trofoblásticas relacionadas com a placenta e membranas fetais de mamíferos foram designadas também de “células gigantes”. Segundo Grunert, (1986), Woicke *et al.* (1986), Marques Júnior (1988), Barreto Filho (1992) e Barreto Filho e Marques Júnior (1993), a diminuição das células maternas, incluindo as células trofoblásticas gigantes nas criptas uterinas, é importante para a liberação das membranas fetais em vacas zebuínas. Aparentemente, se não houver declínio dessas células, o processo de liberação da placenta fica comprometido (William *et al.*, 1987).

Nas vacas Nelores, algumas áreas do epitélio uterino tornam-se colunares, mas não foi observada nenhuma área de desnudamento epitelial conforme os achados de Björkman e Sollen (1960). Isso talvez possa ser explicado porque a maior parte das células trofoblásticas gigantes já concluíram a migração no final da gestação, e a adição de outros elementos celulares determina essa “nova” configuração tecidual no epitélio das criptas carunculares uterinas.

Existe uma diminuição progressiva de células trofoblásticas gigantes na vaca ao longo da gestação, conforme sinalizou Williams *et al.* (1987). Em ovelhas, de acordo com Winsatt (1980), ocorre o contrário, havendo um aumento do número dessas células ao longo da gestação, e em búfalas, segundo Carvalho *et al.* (2006), estas aumentam em número até quatro-seis meses de gestação, mas depois se mantêm constantes até o final desta.

Será mesmo que a diminuição progressiva das células trofoblásticas gigantes fetais ou uninucleadas maternas é o fator responsável pela retenção da placenta? Baseado na discrepância entre estes resultados (fundamentados nos de William *et al.*, 1987) e os resultados de outras espécies de ruminantes, tal fato parece não ocorrer. Observou-se que na vaca Nelore a diminuição do número de células trofoblásticas gigantes pode ocorrer por duas vias: a primeira (menos freqüente) ocorre pela fusão de células trofoblásticas gigantes com células do epitélio uterino formando células trofoblásticas gigantes de três núcleos, e a segunda pelo processo apoptótico normal, que se acentua a partir do 150º dia de gestação.

A maior quantidade de células trofoblásticas gigantes no início da gestação, especificamente no período de pós-implantação, é importante para manutenção da gestação, conforme afirmaram Wathes e Wooding (1981) e Wooding e Staples (1981), porque elas produzem, dentre outros hormônios, a progesterona, um reconhecido e eficiente mantenedor de anestro (Miguez *et al.*, 2005). A diminuição, ao que parece, acontece porque sua função endócrina, mais significativa no início do que no final da gestação, já foi cumprida.

Como na búfala, o epitélio uterino da vaca mostrou-se simples e cúbico, diferindo apenas na manutenção dessa uniformidade em todas as fases da gestação. Talvez a grande diferença entre vacas e búfalas seja a quantidade de células trofoblásticas gigantes nas fases de gestação. O que ocorre na búfala acontece de maneira inversa na vaca, ou seja, o número de células trofoblásticas gigantes é menor no início de gestação, aumentando com o avançar da prenhez.

Podem ser identificadas relações espaciais entre o núcleo, as organelas citoplasmáticas e as inclusões. Estas são visíveis quando a célula apresenta polarização evidente, como acontece na ovelha, Winsatt (1980), e na búfala, Carvalho *et al.* (2006), mas não na vaca Nelore. A explicação para essa diferença pode estar relacionada à quantidade de eucromatina, uma vez que quanto mais heterocromatina, menos ativa é a célula e quanto mais eucromatina, maior o potencial de síntese protéica.

Embora Wooding *et al.* (1996) tenham se reportado à existência de duas populações de células trofoblásticas gigantes em áreas cotiledonária e intercotiledonária, não foi possível corroborar com suas afirmações no que tange aos aspectos morfológicos “idênticos” entre essas células. Todas as evidências indicam que elas partilham do mesmo processo de origem, porém, em vacas Nelore, não foram observadas células trofoblásticas gigantes intercotiledonárias em processo de migração. De acordo com Atkinson *et al.* (1993), ao menos duas subpopulações de células trofoblásticas gigantes estão presentes na placenta ovina.

A natureza associativa da barreira materno-fetal não passa de um recurso morfológico que favorece o reconhecimento entre mãe e feto, impedindo a interrupção da gestação, mas a associação dos tecidos justifica a adoção do termo “sinepiteliocorial” devido às novas publicações a partir do final da década de noventa.

Conclusões

Tendo em vista os resultados e literatura discutida anteriormente, observou-se que, na vaca Nelore, a diminuição do número de células trofoblásticas gigantes pode ocorrer por duas vias: a primeira, pouco freqüente, ocorre pela fusão de células trofoblásticas gigantes com células do epitélio uterino formando células trofoblásticas gigantes de três núcleos, e a segunda pelo processo apoptótico normal, que se acentua a partir do 150º dias de gestação. E finalmente fica claro para os profissionais da área de reprodução animal que a formação dessas células constitui manifestação evolucionária placentária dos ruminantes em relação a uma condição de decídua para não decídua do tipo sinepiteliocorial mais especializada.

Referências

- Amoroso ES.** Histology of the placenta. *Brittanical Med Bull*, v.17, p.81-90, 1961.
- Assheton R.** The morphology of the ungulate placenta, particularly the development of that organ in the sheep, and notes upon the placenta of elephant and hyrax. *Philos Trans R Soc Lond Ser B*, v.198, p.143-220, 1906.
- Atkinson YH, Gogolin-Ewens KJ, Hounsell EF, Davies MJ, Brandon MR, Seamark RF.** Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate - evidence for a new family of pregnancy-associated molecules. *J Biol Chem*, v.268, p.26679-26685, 1993.
- Barreto Filho JB.** Aspectos morfofisiológicos da placentação do zebu (*Bos taurus indicus*). 1992. 106f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- Barreto Filho JB, Marques Junior AP.** Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.45, p.385-393, 1993.
- Björkman N.** Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome, *J Ultrastruct Res*, v.24, p.249-258, 1968.
- Björkman N, Sollen PA.** Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta Vet Scand*, v.1, p.347-362, 1960.
- Carvalho AF, Klisch K, Miglino MA, Pereira FTV, Bevilacqua E.** Binucleate Trophoblast Giant Cells in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Placenta. *J Morphol*, v.267, p.50-56, 2006.
- Duella TM, Byatt JC, Bremel RD.** Immunohistochemical localisation of placenta lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*, v.119, p.1351-1355, 1986.
- Flood PF.** The deservoviment of the conceptus and its relationship to the uterus. In: Cupps PT. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. New York: Academy Press, 1991. p.315-356.
- Greenstein JS, Murray RW, Foley RC.** Observations of the morhogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat Rec*, v.132, p.321-325, 1958.
- Grunert E.** Etiology and pathogenesis of retained bovine placenta. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology* II. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986.
- Hansel W, Stock A, Battista PS.** Low molecular weight lipidsoluble luteotropic factor(s) produced by conceptus in cows. *J Reprod Fertil Suppl*, n.37, p.11-17.
- Hradecky P, Mossman HW, Stott GG.** Comparative development of ruminant placentomes, *Theriogenology*, v.29, p.715-729, 1988.
- Igwebuike UM.** Trophoblast cells of ruminant placenta: a minireview.[on line]. Disponível em: http://www.ictp.it/-pub_off. Acesso em 27 jul. 2004.
- Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R.** DNA contents and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta*, v.20, p.451-458, 1999.
- Marques Junior AP.** Leukocyte chemotaxis activity by cotyledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta. 1988. 182f. Thesis (Doctorat) – University of Illinois, Urbana, 1988.
- Miguez PHP, Cunha PM, Marques VB, Bertan CM, Binelli M.** Combination of estradiol 17- β and progesterone is required for synthesis of PGF2 α in bovine endometrial explants. *Anim Reprod*, v.2, p.172-177, 2005.
- Pandit RK, Shukla SP, Parekh HKB.** Incidence of retention of placenta in Gir cows and their crosses wit special reference to subsequent fertility. *Indian J Anim Sci*, v.51, p.505-507, 1981.
- Roberts SJ.** *Veterinary obstetrics and genital diseases*. 3 ed. Ann Arbor: Edwards Brothers, 1986, 981p
- Verma RP, Isha RR.** Evidence of certain reproductive disorders in different breeds of cattle. *Indian Vet J*, v.61, p.169-170, 1984.
- Wagner WC.** Endocrine physiology of the parturient cow placental retention. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.1, p.61-74, 1989.
- Wathes DC, Wooding FBP.** Na electron microscopic study of implantation in the cow, *Am J Anat*, v.159, p.285-306, 1981.
- William WF, Margolis MJ, Manspeaker J, Douglass LW, Davidson JF.** Peripartum changes in the bovine palcenta related to fetal membrane retention, *Theriogenology*, v.28, p.213-223, 1987.
- Winsatt WA.** Observations on the porphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am J Anat*, v.159, p.209-243, 1980.
- Woicke J, Schoon HA, Heuwieser W.** Morphological and functional aspects of placental maturation

mechanisms in the cow, I – light microscopy. *J Vet Med*, v.33, p.660-667, 1986.

Wooding FBP, Staples LD. Function of the trophoblast papillae and binucleate cells implantation in the shee. *J Anat*, v.133, p.110-112, 1981.

Wooding FBP, Wathes DC. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil*, v.59, p.425-430, 1980.

Wooding FBP, Staples LD, Peacock MA. Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation. *J Anat*, v.134, p.507-516, 1982.

Wooding FBP, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Heap RB. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta*, v.17, p.75-86, 1996.