

**Proliferação Celular em Gestações Naturais e de Conceptos Bovinos Transgênicos Clonados, que Expressam Proteína Fluorescente Verde**

/

**Cell proliferation in pregnancies natural and transgenic conceptos cattle cloned, expressing green fluorescent protein**

DOI:10.34117/bjdv5n12-381

Recebimento dos originais: 07/11/2019

Aceitação para publicação: 02/01/2020

**Fernanda Paes de Oliveira**

Mestra em Ciência e Tecnologia Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Unesp Dracena/Ilha Solteira SP

Instituição: Centro Universitário de Adamantina - Unifai Adamantina SP

Endereço: Campus 2 - Av. Francisco Bellusci, 1000 - Distrito Industrial Otavio Gacazzi, Adamantina - SP, 17800-000, Brasil

E-mail: fernandapaes@fai.com.br

**Vitor Trinca**

Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade de São Paulo – USP

Instituição: Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, SP

Endereço: Av. do Café, s/número, sala 038, Bloco S, Lab. de Análise da Expressão Gênica, Vila Monte Alegre

- Ribeirão Preto, SP 14040903, Brasil

E-mail: vitor.trinca@yahoo.com.br

**Bruna de Oliveira Vasconcelos**

Mestra em Ciência e Tecnologia Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Unesp Dracena/Ilha Solteira SP

Instituição: Fisk Andradina

Endereço: R. São Paulo, 1091 Centro

E-mail: bruna.olivasco@gmail.com

**Ricardo Velludo Gomes de Soutello**

Doutor em Zootecnia na área de Produção Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Unesp Botucatu SP

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Câmpus de Dracena, Unesp

Endereço: Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, Dracena, SP 17900-000, Brasil

E-mail: soutello@dracena.unesp.br

**Fabiana Fernandes Bressan**

Doutora em Ciências, área de concentração Qualidade e Produtividade Animal – Universidade de São Paulo - USP

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP)

Endereço: Endereço Av. Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil

E-mail: fabianabressan@usp.br

**José RV Pimentel**

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP),  
Endereço Av. Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil

**Flávio Vieira Meirelles**

Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo USP  
Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP)  
Endereço: Av. Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil  
E-mail: meirellf@usp.br

**Flávia Thomaz Verechia Rodrigues**

Doutora em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Universidade de São Paulo USP  
Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Câmpus de Dracena, Unesp  
Endereço: L@mpe-Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, Dracena, SP 17900-000, Brasil  
E-mail: verechia@gmail.com

**RESUMO**

Neste estudo, foi avaliada a ocorrência de proliferação celular em placentônios de conceptos bovinos transgênicos clonados e de inseminação artificial, nos períodos de 60 e 90 dias de gestação. As amostras foram recortadas e fixadas em solução de paraformoldeído a 4% em tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7.4, para realização da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados obtidos foram comparados entre bovinos clonados transgênicos e de inseminação artificial. Em todos os grupos e períodos gestacionais, o epitélio fetal apresentou marcação positiva para proliferação celular. Aos 60 dias a marcação positiva no epitélio uterino das gestações manipuladas foi pouco evidente em relação às de gestações naturais. Por sua vez aos 90 dias a imunorreatividade dos placentônios dos conceptos clonados, foi intensa não só no epitélio mas também no tecido conjuntivo fetal, fato não observado na gestação natural, onde a reação positiva foi pouco evidente no tecido conjuntivo fetal. Neste estudo foi demonstrado possível desequilíbrio nos padrões de proliferação celular nos conceptos bovinos clonados transgênicos, pois aos 60 dias, apresentaram menor atividade proliferativa e aos 90 dias aumento. Desse modo os resultados são importantes para a compreensão de possíveis falhas no desenvolvimento gestacional em técnicas avançadas de manipulação embrionárias.

**Palavras-chave:** clonagem, placenta, prenhez, ruminantes, transgenia.

**ABSTRACT**

In this study, the occurrence of cell proliferation was assessed in placentomes by cloned transgenic bovine conceptuses and by artificial insemination, in the 60 and 90 days of gestation. The samples were cut and fixed in paraformaldehyde 4% solution in sodium phosphate buffer 0.1M at pH 7.4, for performing immunohistochemistry. The results obtained were compared between transgenic cloned bovine conceptuses and artificial insemination. In all groups and gestational periods, the fetal epithelium presents positive labeling to cell proliferation. In 60 days gestation the positive labeling of the manipulated gestations was less evident in relation to the natural gestations. On the other hand, in 90 days gestation the immunoreactivity of the placentomes of the cloned conceptuses was more intense, not just in the epithelium, but also in the fetal connective tissue, fact not observed in the natural gestation, where the positive reaction was less evident in the fetal connective tissue. Therefore, the results of verification of cell proliferation and understanding are important for the understanding

of possible fails in gestational development, leading to fetal and placental abnormalities in advanced techniques of embryonic manipulation.

**Keywords:** cloning, placenta, pregnancy, ruminants, transgenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A ampla utilização de biotécnicas de reprodução e produção animal, especialmente a clonagem, demonstrou que a placentação é um dos processos mais comprometidos, pois durante a placentação de bovinos clonados ocorrem alterações anatômicas que provavelmente contribuem para suas baixas taxas de nascimento (Miglino et al., 2007). Para que ocorra um desenvolvimento placentário normal, o útero sofre várias alterações morfológicas, e a placenta passa por um intenso processo de proliferação celular, crescimento vascular placentário e interação materno-fetal (Pfarrer et al., 2006).

Alterações placentárias estão entre as principais causas responsáveis pelas perdas gestacionais de clones bovinos e estão relacionadas à deficiência do desenvolvimento vascular placentário, demora na implantação, formação de número reduzido de placentônios, placentomegalia e conseqüentemente deficiência na funcionalidade da placenta (Bordignon & Smith, 2008). Estas falhas estão relacionadas principalmente com a receptora do embrião e ao desenvolvimento alterado da placenta (Pereira & Freitas, 2009).

De acordo com Mossman (1937) a placenta é aposição de tecidos maternos e fetais, com intenção de trocas fisiológicas. Do ponto de vista morfológico um órgão complexo, que no curso de seu desenvolvimento apresenta modificações quantitativas e qualitativas de sua estrutura macroscópica e diversas modificações microscópicas, sendo os padrões de proliferação celular, uma das alterações importantes para a viabilidade na produção de embriões (Oliveira et al., 2006).

Nesta temática a proliferação celular placentária pode estar relacionada na diferenciação do epitélio uterino e trofoblástico, uma vez que tais tecidos sofrem adaptações constantes a fim de acomodar as necessidades do concepto em crescimento, já que o desenvolvimento placentário normal é de extrema importância para a produção de embriões viáveis e conseqüentemente um dos fatores para o nascimento de neonatos saudáveis. Diante deste contexto o presente estudo teve o objetivo de verificar a proliferação celular em placentônios de conceptos bovinos clonados transgênicos, mediante o modelo com expressão da proteína fluorescente verde (GFP), em comparação com conceptos bovinos oriundos de gestação natural aos 60 e 90 dias, mediante imuno-histoquímica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foi utilizada a técnica de imunohistoquímica de acordo com a metodologia de Pereira et al. (2013) para a identificação da proliferação celular, no qual o anticorpo

Monoclonal Mouse Anti- Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, Clone PC10 -Dako Cytomation®) foi testado. Foram utilizados placentônios bovinos de úteros gestantes de 60 (n=14) e 90 (n=4) dias oriundos de inseminação artificial provenientes de abatedouros frigoríficos da região de Dracena e Pirassununga - SP, e placentônios de conceptos bovinos clonados transgênicos na mesma idade gestacional sendo aos 60 dias (n=3) e 90 (n=2).

As amostras de placentônios bovinos clonados transgênicos foram provenientes do Projeto Jovem Pesquisador FAPESP, processo número 2005/52676-1, sob responsabilidade da Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira, do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião, protocolo CEUA 002/2006 – Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” campus experimental de Dracena, SP - Unesp. Para a marcação GFP foram utilizados fibroblastos fetais bovinos oriundos de feto da raça Nelore, macho, 55 dias de gestação, portador de marcador mitocondrial de *origem indicus*. Estas células foram utilizadas para o desenvolvimento de embriões recombinantes, mediante a técnica de transferência nuclear, e metodologia de enucleação dos oócitos descrita por Pereira et al. (2013).

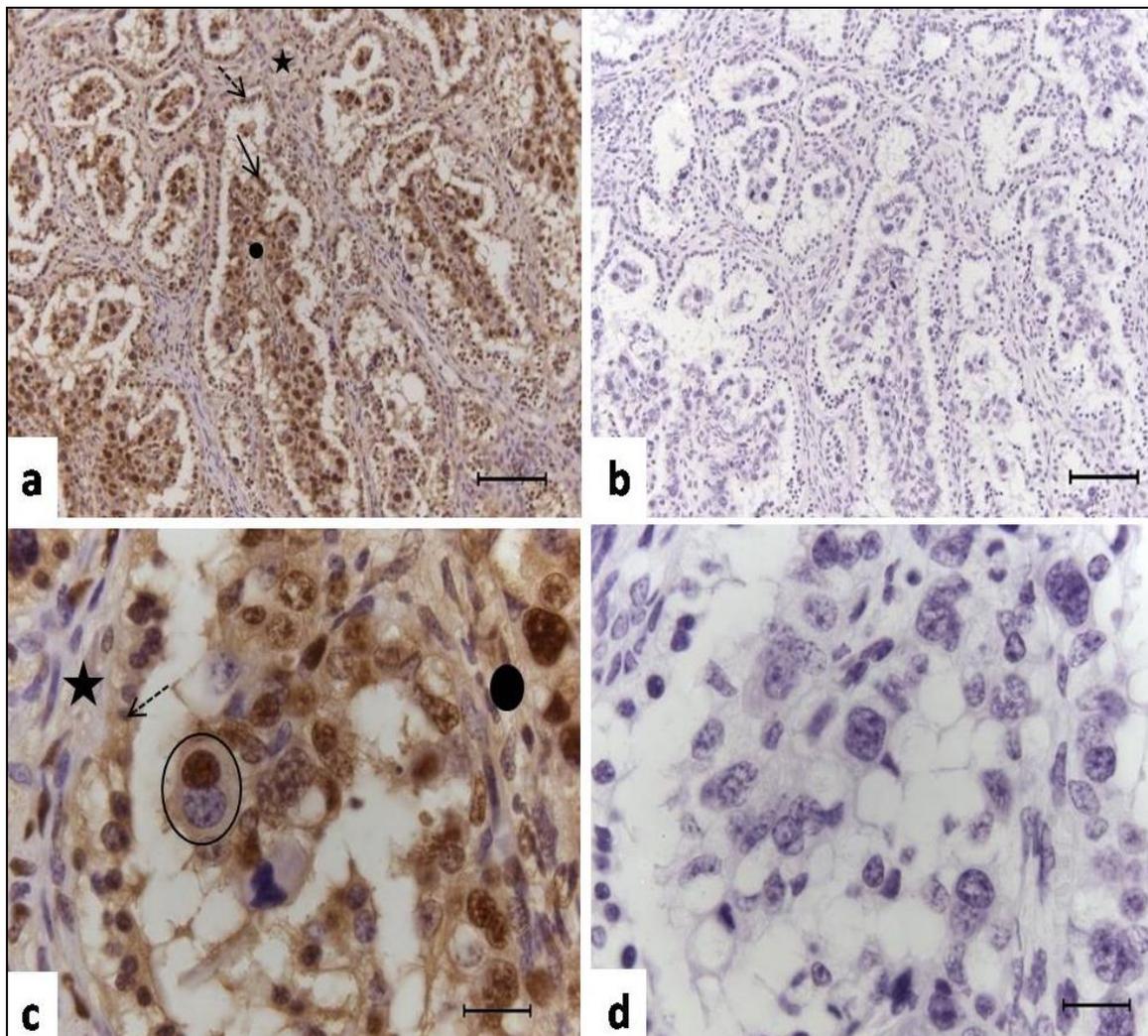
As amostras foram incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 4 µm; desparafinizadas em xilol e reidratadas em etanol. O desmascaramento antigênico foi realizado em tampão citrato por 15 minutos em forno microondas. A atividade de peroxidase tecidual endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. Logo após os cortes foram lavados com solução de tampão fosfato PBS. Em seguida o anticorpo primário foi diluído em tampão PBS e solução de BSA (albumina sérica bovina 3,5%) e incubado “overnight” a 4°C em câmara úmida. Posteriormente o anticorpo secundário Biotiniled Link - Dako® K0690, foi incubado por 60 minutos em câmara úmida a 4°C e lavadas novamente com PBS e incubadas com Streptavidin-HRP Dako® K0690. A reação foi revelada com kit DAB (Diaminobenzidina - DAB-buffer substrate; DAB-chromogen, Dako® K3468). Para finalizar, os cortes foram contracorados com hematoxilina e as lâminas montadas para análise sob microscopia de luz, para a visualização da marcação positiva amarronzada dos núcleos das células em proliferação.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao analisar as características histológicas para as reações de PCNA, ambos grupos e idades gestacionais, foi encontrada a marcação positiva no epitélio fetal, células trofoblásticas gigantes binucleadas, células endoteliais e com menor intensidade no estroma endometrial. Rici et al. (2011) observaram que as células trofoblásticas gigantes binucleadas apresentaram maior marcação em relação às células mononucleadas. Estes dados foram encontrados em nosso estudo e corrobora com

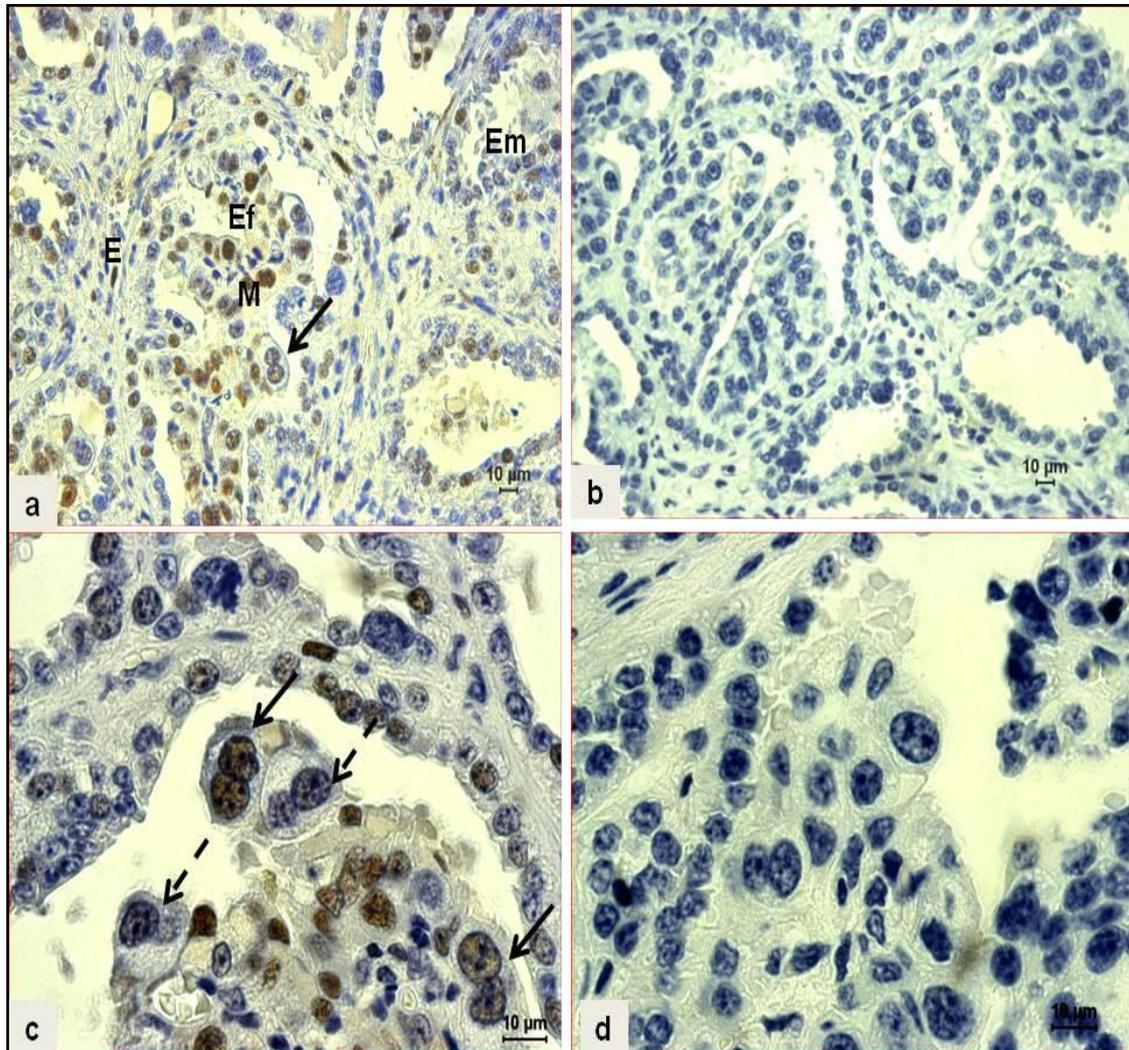
os achados de Trerè (2000) no qual relata que nas células trofoblásticas gigantes binucleadas ocorre uma proliferação mais acentuada.

Nos animais de gestação natural aos 60 dias, verificou-se que a principal reação positiva foi detectada nos epitélios fetal e uterino, e em menor intensidade no tecido conjuntivo fetal (mesênquima) e uterino (estroma endometrial) (Figuras 1a, c; 2a, c). Boos & Stelljes (2000) em trabalhos com placentônios bovinos também observaram menor marcação no estroma endometrial, relatando que a capacidade proliferativa das células do estroma parece ser relativamente baixa, resultados estes que também foram encontrados por Boss et al. (2003) em estudos com placentas bovinas. Yamauchi et al. (2003) em trabalhos com bovinos oriundos de inseminação artificial e de conceptos clonados aos 30-60 dias, observaram marcação positiva no estroma endometrial. Já nos conceptos clonados transgênicos aos 60 dias no presente trabalho (Figura 3a, c) a marcação foi observada com maior evidência no epitélio fetal.

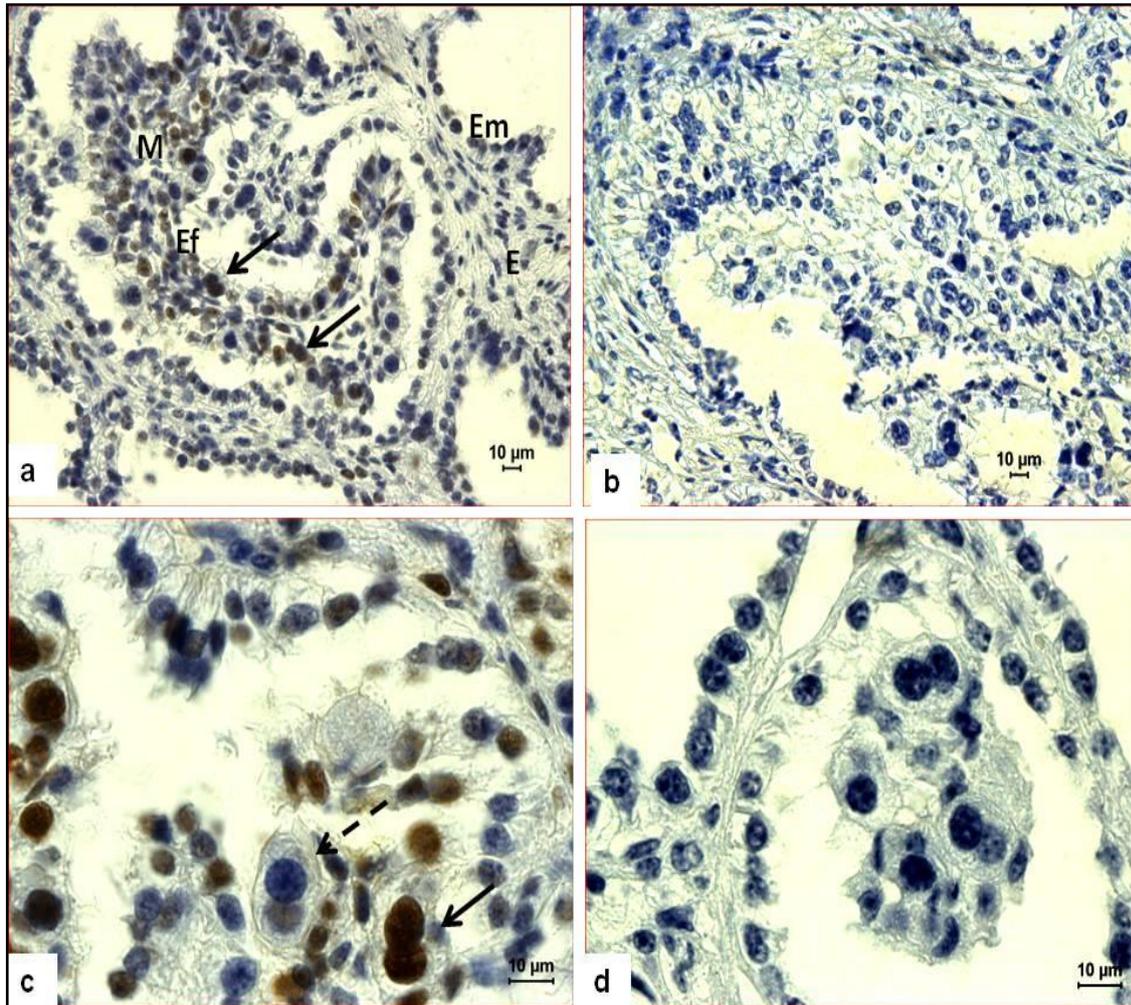


**Figura 1.** Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 60 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal e uterino. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em maior aumento da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica

gigante binucleada circundada (destaque) com imunorreatividade específica, pois apenas um núcleo estava reativo ao anticorpo. d) Controle negativo de b. a,b: barra=100 $\mu$ m; c,d: barra=20 $\mu$ m. Seta cheia, epitélio fetal; seta interrompida, epitélio uterino; (●) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial).



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



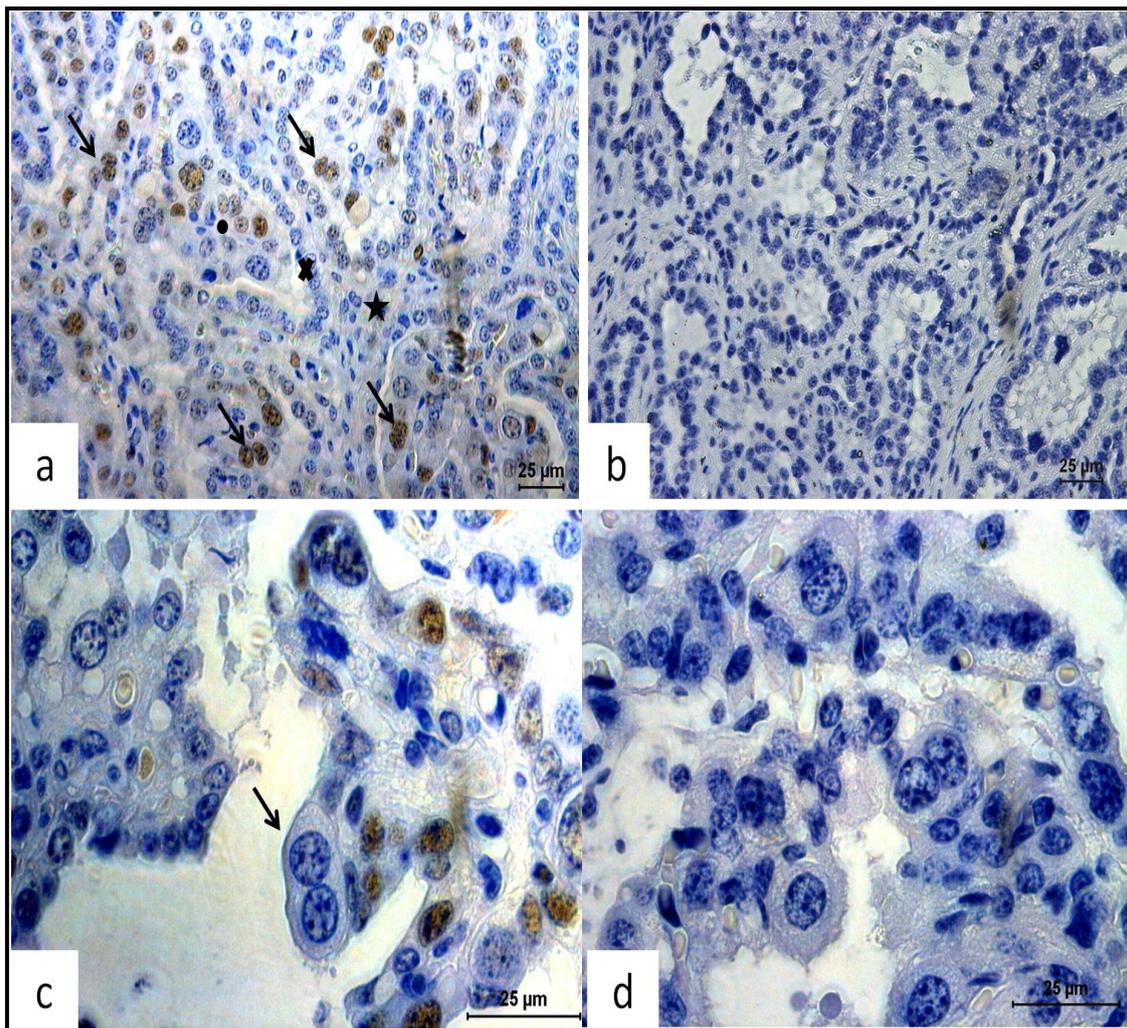
**Figura 3.** Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA); placentônios bovinos de conceptos clonados transgênicos, 60 dias de gestação. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal, e, como nos animais de gestação natural, observamos também a marcação específica do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

Ao observar as células trofoblásticas gigantes binucleadas algumas apresentaram marcação positiva de PCNA em um núcleo e o outro não (Figura 1c, 2c e 3c, 5a), e outras com os dois núcleos marcados (Figuras 2a,c; 3a,c; 4a; 5a,b). A marcação específica de apenas um núcleo pode ser explicada pelo fato do núcleo marcado estar na fase S do ciclo celular e o núcleo negativo estar na fase G2 do ciclo, ou também estes núcleos estarem em estágio imaturos de multiplicação do genoma conforme relatado por Junqueira & Carneiro (2000). Células na fase G2 também foram visualizadas por Faciootti et al. (2009) e Rici et al. (2011) em estudos com placentônios bovinos aos 60-120 dias de gestação.

Na idade gestacional natural aos 90 dias, a reação positiva do PCNA foi detectada no epitélio fetal, e pouca marcação no tecido conjuntivo fetal (mesênquima) (Figura 4a,c). Esta menor

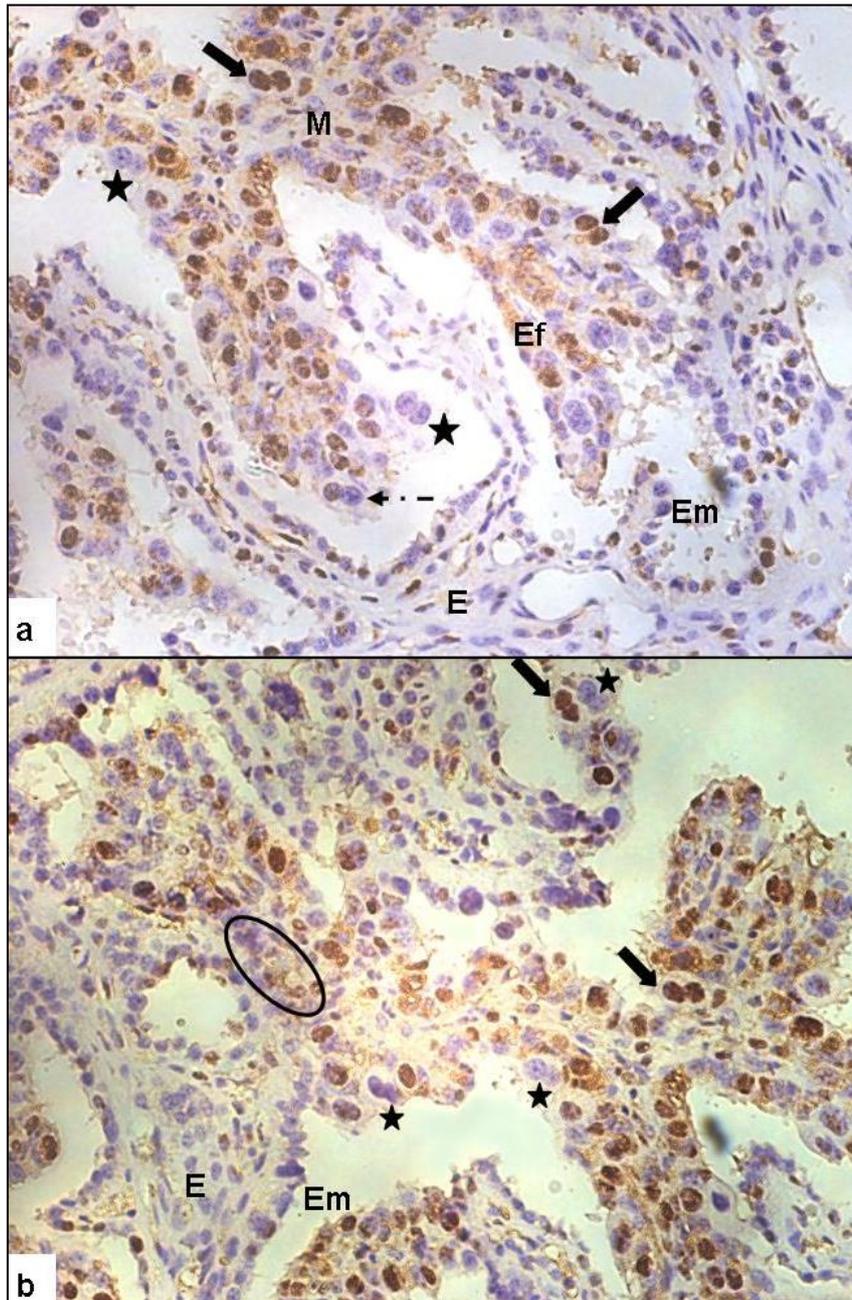
intensidade de marcação pode ser devido ao equilíbrio entre proliferação e apoptose celular, pois a medida que o feto se desenvolve a proliferação diminui e a apoptose aumenta (Boss et al., 2003). Porém nos placentônios bovinos de conceptos clonados transgênicos aos 90 dias de gestação foi observado que a imunorreatividade foi intensa no epitélio e tecido conjuntivo fetal (mesênquima) (Figura 5a,b), em relação à gestação natural, onde a marcação foi pouco evidente no mesênquima, este resultado pode demonstrar uma possível falha nos mecanismos de proliferação celular. Tal período gestacional em condições normais de desenvolvimento placentário é característico pelo início da redução da atividade proliferativa celular nos tecidos placentários/fetais.

Rici et al. (2009) em estudos com bovinos de gestação natural e conceptos clonados no terço inicial da gestação, observaram que animais manipulados em laboratório tinham maior atividade proliferativa comparado aos de gestação natural. Tais fenômenos podem estar associados à placentação deficiente no início da gestação, insuficiência placentária ou até mesmo falta de maturação placentária no final da gestação, eventos que são comuns em manipulações *in vitro* de embriões como a clonagem por transferência nuclear. Bertolini et al. (2007) relata que para ocorrer um crescimento placentário adequado é necessário um conjunto de fatores, sendo um deles o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada (apoptose) de acordo com cada período gestacional.



**Figura4.** Imuno-histoquímica para a proliferação celular (PCNA), placentônios bovinos de gestações naturais aos 90 dias. a) A imunorreatividade foi detectada principalmente no epitélio fetal. b) Controle negativo de a. c) Detalhe em aumento 100x da figura anterior, mostrando uma célula trofoblástica gigante binucleada, seta cheia. d) Controle negativo de c. Seta indicando o epitélio fetal; (x) epitélio materno, (●) tecido conjuntivo fetal (mesênquima); (★) tecido conjuntivo materno (estroma endometrial).

Ao visualizar as células gigantes trofoblásticas binucleadas e/ou multinucleadas dos conceptos clonados transgênicos aos 90 dias, observou-se que parte destas células migraram para o epitélio uterino, com a formação de “aspecto sincicial” (falso sincício) (Figura 5b). Na Figura 5b (elipse), por exemplo, uma parte da interação materno-fetal manteve-se íntegra, não estando separada. Neste local, coincidentemente, formou-se o chamado “falso sincício trofoblástico”, em que células trofoblásticas gigantes binucleadas migram do epitélio fetal para o epitélio uterino, fusionando-se ou não com estas últimas, formando células tri ou multinucleadas. Pereira (2004); Carvalho et al. (2006) relataram que pode ocorrer fusão de células epiteliais uterinas mediante essa movimentação, e formar um evento característico da placenta de bovinos que a classifica como sinepiteliocorial.



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

Em suma, este trabalho verificou aumento visível da marcação de proliferação celular mais aos 90 dias de gestação, que nos leva a inferir um possível desequilíbrio nos padrões de proliferação celular nos conceptos bovinos clonados transgênicos, pois no início da gestação aos (60 dias) apresentaram uma menor atividade proliferativa e no outro período (90 dias de gestação) visivelmente

um aumento; este fato demonstrou que gestações manipuladas em laboratório podem ser atípicas em relação aos parâmetros normais que se espera de uma gestação natural. Sendo assim, tais gestações podem ser menos eficientes para a viabilidade do embrião em termos de eficiência placentária, levando a menor área de troca de substâncias materno-fetais. Desse modo os resultados de verificação da proliferação celular e seu entendimento são importantes requisitos para a compreensão de possíveis falhas no desenvolvimento gestacional em técnicas avançadas de manipulação embrionárias, como a produção de animais transgênicos e a clonagem animal.

#### **4 CONCLUSÕES**

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

#### **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pelo aporte financeiro, ao grupo do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião “L@MPE” na condução do experimento e à Unesp e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal das unidades de Ilha Solteira e Dracena, por todo apoio.

#### **REFERÊNCIAS**

- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R.; GERGER, R.P.C.; BATCHELDER, C.A.; ANDERSON, G.B. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.391-405, 2007.
- BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem animal por transferência nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO JR; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 3.ed. São Paulo: Rocca, 2008. p.347-364.
- BOSS, A.; JANSSEN, J.; MULLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomas during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v.126, p.469-480, 2003.

- BOOS, A.; STELLJES, A. Immunohistochemical detection of collagen types I, III and IV in the bovine uterus during pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.174-175, 2000.
- CARVALHO, A. F.; KLISCH, K.; MIGLINO, M.A.; PEREIRA, F.T.V.; BEVILACQUA, E. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. **Journal of Morphology**, v.267, n.1, p.50-56, 2006.
- FACCIOTTI, P.R.; RICI, R.E.G; MARIA, D.A.; BERTOLINI, M.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A. Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy. **Reproductive Biology Endocrinology**, v.7, n.25, 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000. p. 209-217.
- MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F.T.V.; VISINTIN, J.A.; GARCIA, J.M.; MEIRELLES, F.V.; RUMPF, R.; AMBRÓSIO,C.E.; PAPA,P.C.; SANTOS, T.C.; CARVALHO, A.F.; LEISER,R.; CARTER, A.M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v.68, n.4, p.604-617, 2007.
- MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. Carnegie Inst. Washington Publ. 479. **Contributions to Embryology**, v.26, p.129-246, 1937.
- OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the rock cavy, *Kerodonrupestris* (Wied). **Placenta**, v. 27, n.1, p. 87-97, 2006.
- PEREIRA, A.F.; FREITAS, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.118-128, 2009.
- PEREIRA, F.T.V. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945)**. 2004. 102p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.
- PEREIRA, F.T.V.; OLIVEIRA, L.J.; BARRETO, R.S.N.; MESS, A.; PERECIN, F.; BRESSAN, F.F.; MESQUITA, L.G.; MIGLINO, M.A.; PIMENTEL, J.R.V.; FANTINATO NETO, P.; MEIRELLES, F.V. Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. **PLoS One**, v.8, n.5, 2013.
- PFARRER, C.; WEISE, S.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; LEISES, R.; HOFFMANN, B.; SCHULER, G. Fibroblast growth factor (FGF) -1, FGF2, FGF7 and FGF receptors are uniformly expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. **Placenta**, v.27, p.758-770, 2006.

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

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

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

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