ARLEI JOSÉ BIRCK

**Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da
placenta bovina em cultura celular**

São Paulo
2007

ARLEI JOSÉ BIRCK

Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da placenta bovina em cultura celular

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1897
FMVZ

Birck, Arlei José

Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da placenta bovina em cultura celular / Arlei José Birck. – São Paulo: A. J. Birck, 2007.

129 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez.

1. Conexinas. 2. Bovinos. 3. Placenta. 4. Células gigantes trofoblásticas. 5. Cultivo celular. I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comunicação celular em células binucleadas da placenta de bovinos", protocolo nº547/2004, no qual foram utilizados 30 placentas de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Cellular communication between binucleate cells in bovine placenta", protocol number 547/2004, utilizing 30 bovines (placenta), under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 29 de outubro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BIRCK, Arlei José

Título: Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da placenta bovina em cultura celular

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa Neuza Moreira Marques Birck

“Apenas em torno de uma mulher que ama se pode formar uma família”

Friedrich Schlegel

A meu filho Lucas Henrique

Filhos desde seu nascimento muitos fatos aconteceram na vida do papai, mas sempre em pensamento estive ao seu lado e da mamãe e hoje neste dia tão especial para todos nós ao galgarmos mais um degrau, poderemos então ter mais tempos para ficarmos juntos.

“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso aprendemos sempre”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Por mais que citássemos as pessoas aqui nesta folha de papel sempre acabamos muitas vezes sendo injusto e nos esquecendo de colocar o seu nome, mas saiba que se ele aqui não estiver, que fique registrado que de uma maneira ou outra você colaborou para que tudo isso acontecesse e, de um modo especial o meu muito obrigado.

A Deus

A toda a minha família

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, meu orientador, por compartilhar de seu conhecimento e propiciar da amizade que estabelecemos durante este tempo e, por compreender as minhas idas e vindas.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfuory Jr, por ceder o seu laboratório para que fossem desempenhadas as aplicações práticas de nosso experimento e, ainda estabelecer um bom convívio de respeito e amizade, muito obrigado.

A Rosemary Viola Bosch (Rose), a você minha amiga só tem a lhe agradecer pela ajuda e pela amizade, pelo incentivo e dizer que sem você este projeto não teria se concretizado, fica aqui minha admiração pela competente e dedicada profissional que és, minha gratidão.

A Janaina Munuera Monteiro (Jana), a você também que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, saiba que lhe admiro muito e obrigado pela ajuda dispensada a mim sempre com o maior atenção e alegria, obrigado.

Lílian de Jesus Oliveira, a vida sempre nos reserva coisas boas, obrigado por tudo.

Ao Diogo pela amizade, convivência e momentos de risos no laboratório, valeu.

Fernanda Agreste, pela amizade.

Gisele Saviani pela sensibilidade e ajuda nas horas que precisei pude contar com você, ficai registrado aqui neste trabalho a nossa amizade, muito obrigado.

Aos professores e servidores técnico administrativo do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por me acolherem em seu convívio.

Ao frigorífico Mantiqueira, localizado na cidade de São José dos Campos, ao pessoal da linha de abate, aos Veterinários do SIF, e Diretores do frigorífico por cederem suas dependências e material para realização de nosso estudo.

UFPR Universidade Federal do Paraná Campus Palotina, esta universidade que me acolheu por 14 anos e que me deu oportunidade de crescer como ser humano e intelectualmente e, aos grandes amigos que lá deixei, meu muito obrigado.

Universidade Federal de Lavras – UFLA, minha nova casa onde pretendo demonstrar meu conhecimento teórico e prático adquirido através de muitas horas de dissecação e pesquisa, obrigado por me acolherem de portas abertas.

Aos técnicos e secretários do curso de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelos anos de amizade e convívio.

A Henrique Ribeiro Alves de Resende, ex-colega de pós-graduação, amigo e hoje colega de trabalho, quem diria, mas a vida nos reserva sempre muitas surpresas, a você também meu mestre, a quem me espelho, meu muito obrigado.

A Luciano da Silva Alonso ex-colega também, amigo sempre disposto a ajudar e a contar muitos casos hilários, um abraço.

A André Luís Filadelfo pela amizade construída desde o mestrado e que permanece até hoje não importando a distância.

RESUMO

BIRCK, A. J. Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da placenta bovina em cultura celular. [Expression of connexins 32 and 43 in trophoblast cells of the bovine placenta in cell culture]. 2007. 129 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

A expressão da conexina 32 e 43 nas células gigantes trofoblásticas foi analisada em condições de cultura celular com e sem influência de hormônios sexuais. Placentônios bovinos foram coletados de vacas prenhes em abatedouro nos diferentes períodos gestacionais e divididos em três grupos, primeiro terço (I), segundo terço (II), terceiro terço (III) e transportados ao laboratório em condições assépticas à temperatura de 4°C em solução de PBS com antibiótico. No laboratório as células foram isoladas e cultivadas em meio D-MEM com 10% SFB por cinco dias. As detecções das conexinas 32 e 43 foram realizadas através de imunofluorescência, pelo método de amplificação da tiramida-fluoresceína, utilizando anticorpo primário policlonal a imunoglobulina de coelho, anti-conexina 32 e 43 de camundongo. Os resultados mostraram que as células gigantes trofoblásticas expressam conexinas 32 e 43 nos três períodos gestacionais com exceção da Cx32 no primeiro terço gestacional sem adição de hormônios, a qual passou a expressar fluorescência após a adição de hormônios. A distribuição da Cx43 evoluiu com a progressão da gestação, permanecendo limitada ao interior das células gigantes trofoblásticas, sem formar junções comunicantes. O terceiro terço gestacional mostra a Cx43 na CGTT localizada no interior do núcleo. A adição de hormônios ao meio de cultura vem confirmar que a progesterona e o estrógeno podem ter um papel no controle da Cx32. Para Cx43 onde se adicionou progesterona os níveis de expressão foram baixos no início aumentando no decorrer da gestação, o mesmo foi encontrado para o conjugado de progesterona/ estrógeno. Para o estrógeno no grupo I os níveis de expressão foram menores se comparados aos três grupos diminuindo no grupo II e voltando a aumentar no grupo III.

Palavras chave: Conexina. Bovinos. Placenta. Células gigantes trofoblásticas. Cultivo celular.

ABSTRACT

BIRCK, A. J. Expression of the connexins 32 and 43 in trophoblast cells of the bovine placenta in cellular culture. [Expressão das conexinas 32 e 43 em células trofoblásticas da placenta bovina em cultura celular]. 2007. 129 f. Tese (Tese em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

The trophoblast cells expression of connexins 32 and 43 was studied in cell culture conditions with or without influence of sexual hormones. Bovine placentomes were collected from pregnant cows in slaughterhouses in different gestational periods and so divided into three groups, first term (I), second term (II), and third term (III), and transported to the laboratory in aseptic conditions at a temperature of 4⁰C in PBS solution with antibiotics. At the laboratory the cells were isolated and cultivated in D-MEM environment with 10% SFB for five days. The detections of connexins 32 and 43 were achieved through immunofluorescence, by the tyramide-fluorescein amplification method, using a rabbit polyclonal primary antibody anti-connexin 32 and 43 of mice. The results showed that the trophoblast cells expressed connexins 32 and 43 in the three gestational periods with an exception of the Cx32 at the first gestational period. However, after the addition of sexual hormones, they began to express the connexins in the cytoplasm in the first stage. The distribution of the Cx43 evolved with the progression of the gestation, remaining limited to the trophoblast's cells interior, without formation of gap junctions. The third gestational term shows the Cx43 located inside the nuclei of the CGTT. Addition of hormones in the culture environment confirmed that estrogen and progesterone may have an important action controlling Cx32. For Cx43, the expression was low after prosterone was added to the culture medium, but increased as the gestation evolved, the same was found for a combined compost of estrogen\ progesterone. For estrogen, in group I the expression levels were inferior when compared to the three groups decreasing in group II and increasing again in group III. We may conclude that the sexual hormones, specially estrogen, affect the expression of connexins in trophoblastic cells.

Key words: Connexin. Cow. Placenta. Trophoblast giant cells. Cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Terços gestacionais. (A) fotografia de um feto no primeiro terço gestacional; (B) fotografia de um feto no segundo terço gestacional; (C) fotografia de um feto no terceiro terço gestacional; (D) fotografia de um placentônio do terceiro terço gestacional. (barra = 20 μ m)..... 57
- Figura 2 - Fotografias do quinto dia de cultivo de células placentárias bovina. (A) cultura de células placentárias bovinas do primeiro terço gestacional; (B) cultura de células placentárias bovinas do segundo terço gestacional; (C) cultura de células placentárias bovinas do terceiro terço gestacional. Objetiva 100X – (barra = 23 μ m)..... 61
- Figura 3 - Fotomicrografia de célula gigante trofoblástica binucleada do terceiro terço gestacional da placenta bovina em cultura. A imagem apresenta uma CGTB bovina, com os dois núcleos corados pelo iodeto de propídeo expressando vesículas de heterocromatina globosas. Ao redor dos núcleos, em verde, na região do citoplasma observa-se a expressão da Cx43. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 25 μ m)..... 75
- Figura 4 - Fotomicrografias da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase gestacional obtida com auxílio de microscópio confocal. A imagem realizada com filtro verde mostra a marcação do núcleo da CGTB pelo iodeto de propídeo em vermelho. A imagem mostra que não ocorreu marcação para a Cx32. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 76
- Figura 5 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. Verificamos células gigantes trofoblásticas binucleadas (seta simples) e células gigantes trofoblásticas mononucleadas (seta dupla) marcadas pela presença da Cx32 em verde intenso. A imagem mostra com exatidão a delimitação dos núcleos marcados pelo iodeto de propídeo em vermelho, com a marcação da Cx32 em algumas células e está pouco expressiva na CGTB, já para a CGTM a Cx32 aparece lateralmente ao núcleo da célula. Dupla coloração para conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 77

- Figura 6 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem mostra com exatidão a delimitação do núcleo da CGTM (seta simples) marcada pelo iodeto de propídeo em vermelho, com a Cx32 localizada no citoplasma. A seta dupla mostra a marcação da Cx32 na CGTB no citoplasma. Dupla coloração para conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 78
- Figura 7 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em terceira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem mostra a expressão da Cx32 na CGTB (seta simples) e na CGTM (seta dupla) ambas com o núcleo corado em vermelho pelo iodeto de propídeo. Na CGTB (seta simples) a Cx32 esta disposta lateralmente ao núcleo da célula, na CGTM (seta dupla) a Cx32 expressa também marcação voltada lateralmente para um dos pólos da célula. Dupla coloração para conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 79
- Figura 8 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem observada com filtro simples mostra com exatidão a delimitação dos núcleos marcados pelo iodeto de propídeo em vermelho para ambos os tipos celulares. A imagem mostra uma forte marcação para a Cx43 na grande maioria das células em cultura. A imagem (cabeça da seta) mostra as CCT com núcleo menor; as células identificadas pela (estrela) mostram a CGTM; (seta simples) mostra a CCT expressando a Cx43 voltada para células que estão próximas a elas; a (seta dupla) mostra a CCT expressando a Cx43 voltada para uma CGTB com a Cx43 na região do citoplasma. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 80
- Figura 9 - Fotomicrografias da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem (A) mostra a CGTB (seta) expressando a Cx43 em verde intenso em forma de pontuações e também mantendo sinalização com uma célula colunar trofoblástica. A imagem (B) mostra a CGTM (seta dupla) com heterocromatina intensa e Cx43 sendo expressa no citoplasma e sobre o núcleo da célula; a CCT (seta simples) mostra a expressão da Cx43 voltada para o lado da CGTM. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μ m)..... 81

- Figura 10 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação. A imagem mostra a CGTB (dupla) expressando a Cx43, em fina granulação verde em áreas mais distantes dos núcleos e com uma pequena expressão sobre o núcleo duplo e a CCT (seta simples) com vários pontos de adensamento de heterocromatina apresenta marcação mais intensa da Cx43 no interior do núcleo, demonstrando pouco a marcação do núcleo pelo iodeto de propídeo. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 82
- Figura 11 - Fotomicrografias de cultura de células da placenta bovina do segundo terço gestacional. A imagem (A) realizada com filtro duplo, mostra a expressão da Cx43 no interior da CGTM (seta simples), já a marcação para a CGTB (seta dupla) mostra que a Cx43 está presente na área do citoplasma. A imagem (B) realizada com filtro duplo, mostra a Cx43 (seta simples) distribuída no citoplasma da célula CCT, a (seta dupla) mostra a CGTM próxima a uma CCT com forte expressão de Cx43, a CGTM está em contato com uma CCT. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 83
- Figura 12 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em terceira fase da gestação. A imagem mostra a CGTB (seta simples) onde a Cx43 está localizada encobrindo o núcleo das células o mesmo acontece para as CGTM (seta dupla) com vários pontos de adensamento de heterocromatina. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)..... 84
- Figura 13 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina da terceira fase gestacional. A imagem mostra a Cx43 sobre o núcleo da célula, nota-se que nas áreas onde a heterocromatina apresenta suas vesículas a conexina apresenta-se mais esparsa. O núcleo da CGTT marcada pelo iodeto de propídeo em vermelho evidenciando grandes vesículas de heterocromatina, a Cx43 é vista com finos grânulos dispostos ao redor dos três núcleos marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μ m)..... 85
- Figura 14 - Fotomicrografias da cultura de células trofoblásticas bovina da terceira fase gestacional. A imagem (A e B) mostra que quando a série de imagens é empilhada e observada em corte transversal, pode-se notar que a Cx43 está co-localizada com a cromatina no interior do núcleo. Dupla coloração para conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μ m)..... 86

- Figura 15 - Fotomicrografias de cultura de células placentária bovina com adição de progesterona. A imagem (A) primeiro terço gestacional; (B) segundo terço gestacional; (C) terceiro terço gestacional. Temos em verde a expressão da Cx32 lateralmente as CGT, contrastando com o vermelho dos núcleos marcados. Na imagem (A) a Cx 32 começa a ser expressada após a adição de progesterona. Na imagem (B) a Cx32 inicia a expressão. A imagem (C) mostra um aglomerado de células trofoblástica expressando a Cx32 em verde, e vários núcleos agrupados e marcados, em vermelho, pelo iodeto de propídeo, neste grupo celular podemos evidenciar uma grande expressão para a Cx32. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)..... 87
- Figura 16 - Fotomicrografias de cultura de células placentária bovina com adição de estrógeno. A imagem (A) primeiro terço gestacional; (B) segundo terço gestacional; (C) terceiro terço gestacional. Temos em verde a expressão da Cx32 lateralmente as CGT, contrastando com o vermelho dos núcleos marcados. A imagem (A) mostra aglomerado de CGT expressando a Cx32 em verde lateralmente aos núcleos celulares. Na imagem (B) temos as CGT com expressão da Cx32 nas áreas mais distantes do núcleo. A imagem (C) apresenta maior expressão da Cx32 em muitas CGT, quando comparamos com as demais imagens. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)..... 88
- Figura 17 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona/ estrógeno. A imagem (A) mostra no primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT com uma marcação pouco expressiva para Cx32. Na imagem (B) segundo terço gestacional tem as CGT com expressão da Cx32 encobrendo algumas células e em outras ficando evidente o núcleo marcado pelo iodeto de propídeo. A imagem (C) mostra no terceiro terço gestacional uma maior expressão da Cx32 em muitas CGT, em forma de nuvem encobrendo praticamente os núcleos da CGT marcados com iodeto de propídeo impedindo a visualização da heterocromatina. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)..... 89
- Figura 18 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona. A imagem (A) mostra o primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT com pouca marcação nas células para Cx43. Na imagem (B) segundo terço gestacional mostra as CGT com expressão da Cx43 ao redor dos núcleos ficando evidente o núcleo marcado pelo iodeto de propídeo. A imagem (C) mostra o terceiro terço gestacional uma maior expressão da Cx43 em muitas CGT, forma uma marcação ao redor dos núcleos. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)..... 90

Figura 19 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas em primeiro terço gestacional com adição de estrógeno e expressão da Cx 43. A imagem (A) mostra um aglomerado de células trofoblástica expressando a Cx43 em verde, e vários núcleos agrupados e marcados, em vermelho, pelo iodeto de propídeo. A imagem (B) mostra a Cx43 dispersa entre as células trofoblásticas. A imagem (C) mostra uma nuvem de conexina ofuscando a imagem dos núcleos celulares. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m).....

91

Figura 20 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona/ estrógeno para analisar a expressão da Cx43. A imagem (A) mostra no primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT apresentando a conexina entre células da cultura placentária, deixando os núcleos celulares visíveis. Na imagem (B) segundo terço gestacional mostra as células da cultura com a conexina próxima ao núcleo celular, as células nesta fase apresentam formação de heterocromatina. A imagem (C) mostra o terceiro terço gestacional. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m).....

92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstração da evolução do período gestacional através das medidas de comprimento dos fetos, obtidas do topo da cabeça, osso occipital, à base da cauda, primeira vértebra coccígea. Fonte: Mies Filho, (1987).....	56
Tabela 2 - Representação do controle realizado para os três terços gestacionais.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFT – Ácido fosfotungico
CCT – Células colunares trofoblásticas
CGT – Células gigantes trofoblásticas
CGTB – Células gigantes trofoblásticas binucleadas
CGTT – Células gigantes trofoblásticas trinucleadas
Cx - Conexina
Cx32 – Conexina 32
Cx43 – Conexina 43
D-MEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
GJIC - Gap junction intercelular
hCG – Gonadotrofina coriônica humana
hPL – Lactogênio placentário humano
JC – Junção comunicante
kDA – Kilo Dalton
PGE – Prostaglandina série E
PGF – Prostaglandina série F
pH – Potencial de hidrogênio
RT – Retenção placentária
TNB – Tampão bloking buffer
TSA – Tyramida signal amplification
VNT – Volume nuclear total
ng - Nanograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	26
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3.1	CONCEITOS DE PLACENTA E PLACENTAÇÃO.....	28
3.2	CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS MONONUCLEADAS.....	30
3.3	RESPOSTA MATERNAL A IMPLANTAÇÃO DO CONCEPTO	30
3.4	PAPEL NA NUTRIÇÃO FETAL	31
3.5	CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS BINUCLEADAS	32
3.6	PAPEL NA IMPLANTAÇÃO DO CONCEPTO	38
3.7	FUNÇÃO ENDÓCRINA DA CÉLULA BINUCLEADA.....	38
3.8	CONEXINAS	39
3.9	CONEXINAS EM PLACENTA	45
3.9.1	Conexinas e canais de comunicação intercelular	45
3.9.2	Hipóteses para formação de CGT	46
3.10	A PLACENTA BOVINA E SUA MATURAÇÃO.....	47
3.11	APOPTOSE	52
4	MATERIAL E MÉTODO	54
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	55
4.2	COLETA DE TECIDOS	57
4.3	CULTURA DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS	58
4.4	CULTURA CELULAR.....	58
4.5	CONTAGEM DA VIABILIDADE CELULAR	59
4.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	59
4.7	APLICAÇÃO DE HORMÔNIOS EM CULTURA.....	64
4.7.1	Aplicação de progesterona.....	65
4.7.2	Aplicação de estrógeno.....	65
4.7.3	Aplicação de estrógeno conjugado a progesterona.....	66
5	RESULTADOS	67
5.1	CULTIVO.....	67

5.2	CONSTITUIÇÃO DOS TIPOS CELULARES NOS TRÊS GRUPOS GESTACIONAIS	68
5.3	EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 32 E 43 SEM ADIÇÃO DE HORMÔNIOS	70
5.3.1	Conexina 32	70
5.3.2	Conexina 43	71
5.4	EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 32 E 43 COM ADIÇÃO DE HORMÔNIOS	72
5.4.1	Conexina 32 (progesterona)	72
5.4.2	Conexina 32 (estrógeno)	73
5.4.3	Conexina 32 (progesterona/estrógeno)	73
5.4.4	Conexina 43 (progesterona)	73
5.4.5	Conexina 43 (estrógeno)	74
5.4.6	Conexina 43 (progesterona/estrógeno)	74
6	DISCUSSÃO	93
6.1	CULTURA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS	95
6.2	GRUPO I CULTURA PURA	97
6.3	GRUPO II CULTURA PURA	98
6.4	GRUPO III CULTURA PURA	98
6.5	EXPRESSÃO DA CONEXINA 32 EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS	99
6.6	EXPRESSÃO DA CONEXINA 43 EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS	103
6.7	HORMÔNIOS	102
6.7.1	Progesterona	104
6.7.1.1	Conexina 32	104
6.7.1.2	Conexina 43	106
6.7.2	Estrógeno	107
6.7.2.1	Conexina 32	107
6.7.2.2	Conexina 43	108
6.7.3	Progesterona/ estrógeno	108
6.7.3.1	Conexina 32	109
6.7.3.2	Conexina 43	109
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos tecidos, as células se prendem umas às outras através de modificações de suas membranas, conhecidas coletivamente como junções celulares. Muitas vezes a principal função dessas estruturas é aderência entre as células, como o que acontece com os desmossomas e as *zonulae adherentes*, outras vezes seu papel é vedar o espaço intercelular, impedindo o trânsito extracelular das moléculas de tal modo que a passagem é realizada por via intracelular e sob o controle das próprias células. A especialização da membrana para construir esta estrutura de vedação chama-se junção oclusiva ou *zonula occludens* (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997). Há também em alguns locais mais restritos, modificações das membranas de células adjacentes permitindo a passagem intercelular de íons e moléculas pequenas, que transferem informações através de sinais químicos, integrando a atividade de conjuntos celulares. Estes conjuntos apresentam acentuada unidade funcional, pois todas as células respondem aos estímulos (hormonais e nervosos) recebidos, mesmo que estes estímulos sejam captados por apenas algumas células do conjunto (SCHLAFFER et al., 2000).

A comunicação de célula a célula está diretamente relacionada à transmissão de sinais de regulação entre células em desenvolvimento, transmissão esta que ocorre através de junções comunicantes. Isso habilita que todas as células no embrião podem comunicar-se entre si (POTTER et al., 1966). As células podem trocar moléculas citoplasmáticas de pequeno tamanho e íons inorgânicos através das junções comunicantes. Embora existam outras maneiras pelas quais elas possam se comunicar, a junção comunicante fornece uma interação imediata e individualizada entre o ambiente citoplasmático de células vizinhas (BRUZONE et al., 1996; STEINBERG, 1998).

A junção comunicante intercelular coordena atividades celulares durante o processo de desenvolvimento e diferenciação, sua deficiência funcional ou mutação de genes de conexinas foram implicadas nos processos patológicos (CRONIER et al., 2001).

Os canais das junções comunicantes ou “nexos” são compostos de proteínas transmembranas chamadas conexinas e a mensagem é direcionada de célula para célula através destes canais por meio de um contato específico e direto, estabelecendo uma comunicação pela qual as células vizinhas sincronizam seu metabolismo. As membranas das células comunicantes devem oferecer meios de estabilizar as interações através de outras junções como as junções estreitas, assegurando assim que as mensagens sejam corretamente entregues durante o tempo necessário para o destinatário. Moléculas responsáveis pela adesão e reconhecimento intercelular como as caderinas também podem estar envolvidas no mecanismo de controle da comunicação (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2001). Além disso, a de proteínas que compõem a família das conexinas contribui para o ajuste no processo de transferência de mensagens através das junções comunicantes. A maioria das células expressa múltiplas conexinas que pode associar-se a formar junções comunicantes potencialmente contendo mais de uma conexina (BRUZZONE et al., 1996; YAMASAKI; NAUS, 1996).

As alterações na estrutura das conexinas causadas por mutações podem perturbar tanto a formação das junções comunicantes como o controle da proliferação celular por um efeito dominante negativo (DUFLOT-DANCER et al., 1997; OMORI et al., 1997).

Sabe-se atualmente que a ausência de comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes entre as células cancerosas (comunicação homóloga) ou entre as células sadias e cancerosas (comunicação heteróloga) é importante na expansão clonal do câncer (YAMASAKI, 1991). A principal função das junções comunicantes é a rápida regulação e transmissão de informações moleculares por meio de uma cadeia interconectada de células e o desacoplamento no caso de células danificadas (BRUZZONE et al., 1996). Estas propriedades formam a base para o desenvolvimento de conexinas em células de crescimento, proliferação, diferenciação e fusão (YAMASAKI, 1991; CRONIER et al., 1994).

Os canais intercelulares compostos de conexinas diferentes têm propriedades particulares em termos de permeabilidade molecular, condutância unitária e regulação da abertura do canal, esta hipótese de que a expressão de múltiplas conexinas, no embrião de pré-implantação,

permite ao conceito sofrer rápida diversificação de tipos celulares, que é necessária ao estabelecimento dos dois tecidos: o embrionário (fetal) e o extra-embrionário (saco vitelínico e placenta) (HOUGHTON et al., 2002).

No trofoblasto, a comunicação célula a célula ou entre as subpopulações de trofoblasto é responsável pela invasão, crescimento da placenta e transporte materno-fetal. Este aspecto é de interesse especial por acreditar-se que, canais intercelulares coordenam processos de proliferação e diferenciação celular (WINTERHAGER et al., 1999).

Por ocasião do parto, a vaca libera as membranas fetais da placenta em torno de três a oito horas após a expulsão do feto (ROBERTS, 1971). Não são incomuns a ocorrência de atraso no processo de liberação da placenta com subsequente retenção da mesma, sendo esta uma das alterações puerperais mais freqüentes em vacas leiteiras (SCHEIDEGGER et al., 1993). Durante a gestação ocorrem mudanças estruturais no placentônio que estão relacionadas à subsequente liberação normal da placenta (BJORKMAN; SOLLEN, 1960; WILLIAMS et al., 1987; MARQUES JR., 1988; BARRETO FILHO; MARQUES JR., 1993). A diminuição do número de células epiteliais ao final da gestação é um aspecto importante no processo de maturação da placenta e subsequente separação entre os tecidos materno e fetal (GRUNERT, 1986). Os mecanismos fisiológicos que determinam este processo não estão totalmente esclarecidos, mas possivelmente ocorrem processos de degeneração gradativa das células epiteliais ao longo da gestação (WAGNER, 1989).

O envolvimento das células binucleadas do trofoblasto no processo de maturação e liberação da placenta aparentemente exerce influência sobre a síntese das prostaglandinas que interferem no mecanismo de liberação normal da placenta (GROSS; WILLIAMS, 1986). Estas modificações estruturais do placentônio no processo de liberação normal da porção fetal da placenta em vacas indicam a imaturidade do placentônio por ocasião do parto, sendo um fator determinante para a ocorrência de retenção placentária (GROSS et al., 1987).

Recentemente, foi observado que as células binucleadas de placenta expressam Cx32 ao longo de todas as três fases gestacionais (PFARRER et al., 2006; CARVALHO, 2004). Estas

conexinas também foram observadas no núcleo das células binucleadas da primeira fase gestacional.

Na maioria dos tecidos a expressão da conexina é específica, mas em alguns órgãos essa expressão pode intensificar-se, ou não, e quando isso acontece a função celular pode ser coordenada sob a influência de hormônios. Por exemplo, células gigantes trofoblásticas que se comunicam através das junções gap poderiam coordenar suas funções em bloco (MACKENZIE; GARFILD, 1985; PETROCELLI; LYE, 1993; GRÜMMER et al., 1994). A implantação eficaz do embrião no útero depende da interação entre fatores hormonais (progesterona e estrogênio) que controlam a síntese do epitélio trofoblástico, como a célula gigante trofoblástica binucleada sendo a progesterona o hormônio mais ativo presente em quase todo período da gestação (GLASSER; CLARK, 1975; REIMERS et al., 1985; PSYCHOYS, 1973).

Estudos realizados com a Cx43 e Cx26 no endométrio de ovelhas durante as quatro fases do ciclo estral mostraram que no diestro ocorre fraco aumento de progesterona e imunolocalização da Cx43 acima do epitélio uterino. Durante a fase do estro ocorre significativa elevação da Cx43 no estroma, não sendo observada expressão da Cx26. Durante a fase de justaposição que acontece aos 15 dias a distribuição e a intensidade da Cx43 permaneceu igual à fase do estro. Na fase de fixação do blastocisto a Cx43 apresentou aumento no número e tamanho das placas juncionais dentro do estroma e nas zonas carunculares e intercarunculares em ambos os cornos uterinos gravídicos. Com o avanço da gestação a região interplacentomal apresentou reduzida expressão da Cx43 aumentando no estro na área placentomal, e diminuindo próximo ao parto (GABRIEL et al., 2004).

Desta forma, os hormônios sexuais parecem influenciar a expressão das conexinas no útero e, possivelmente, na placenta. Uma vez que Carvalho (2004) e Pfarrer (2006) demonstraram a expressão das conexinas 32 e 43 em cortes histológicos da placenta de vacas, neste trabalho resolvemos verificar se as conexinas também são expressas em células placentárias em cultura e se a adição de hormônios sexuais ao meio de cultura altera sua expressão.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é:

- Adaptar técnicas de cultura celular de células gigantes trofoblásticas (CGT);
- Verificar o comportamento e a distribuição da Cx32 e Cx43 em células gigantes trofoblásticas em cultura obtidas em diferentes fases gestacionais;
- Verificar como os hormônios sexuais interferem na expressão da Cx32 e Cx43 em células gigantes trofoblásticas em cultura obtidas em diferentes fases gestacionais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para maior sistematização dos assuntos pesquisados, buscamos levantar tópicos enfocando: aspectos gerais da placenta bovina, aspectos específicos das células gigantes trofoblásticas bovinas, informações sobre as conexinas e, sobre a ocorrência em placentas.

3.1 CONCEITOS DE PLACENTA E PLACENTAÇÃO

No início do desenvolvimento embrionário, processos de intercâmbios fisiológicos tais como respiração e nutrição exigem disposições morfológicas especiais normalmente caracterizadas por uma íntima relação entre o conceito e o epitélio uterino materno. Estas modificações acontecem normalmente em meio a um evento biológico típico denominado *placentação* que caracteriza a maioria das espécies de mamíferos da classe *Eutheria*. A partir disso outras funções agregam-se e completam estes processos culminando com a formação de um órgão transitório conhecido como placenta, responsável pelo suporte metabólico, proteção mecânica, e imunológica do feto (MORAIS-PINTO, 2002).

A placenta é um órgão formado por tecido materno e fetal com a função de transportar substâncias nutritivas do organismo materno para o feto, bem como realizar trocas metabólicas e ainda desempenhar funções endócrinas quanto à produção de hormônios responsáveis pela manutenção da gestação, e fenômeno de parto (LEME; SANTOS, 1996; ENDRES BLAKENSHIP, 1999). A placenta desempenha ainda a função de proteção contra a penetração de agentes nocivos (moléculas e microrganismos) para o organismo fetal, bem como o controle seletivo contra a penetração de outras substâncias (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A separação do sangue materno e fetal é sempre mantida por uma elaborada rede de capilares sanguíneos que recobrem os vasos fetais. Em bovinos, a camada mais externa deste tecido fetal, o trofoblasto, está em íntimo contato com o epitélio uterino (ENDRES; BLAKENSHIP, 1999). É dada a estas circunstâncias no delicado equilíbrio das interações materno-embriológicas no sítio de implantação do blastocisto o sucesso do estabelecimento da prenhez que requer uma delicada interação entre o embrião e o ambiente uterino (DUC-GOIRAN et al., 1999). Durante a pré-implantação, a comunicação materno-embrionária é mediada pelo trofoblasto. A janela de implantação representa o período de máxima receptividade uterina para implantação. Em resposta aos sinais do embrião, proteínas específicas da gestação são liberadas no soro materno e uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e imunológicas ocorrem no ambiente uterino (DUC-GOIRAN et al., 1999). A implantação marca o estágio de transição no processo da gestação, na qual o blastocisto assume posição fixa e inicia relacionamento de alterações fisiológicas com o útero. A primeira associação entre o blastocisto e útero estabelecendo uma posição definida é freqüentemente denominada “attachment” (adesão) que pode ser subdividida em dois estágios, o primeiro aposicional e o subsequente, de adesão (SCHLAFKE; ENDERS, 1975).

Inicialmente o embrião obtém substratos metabólicos essenciais a partir do líquido existente na luz uterina, chamado histotrófo ou “leite uterino”, composto por metabólicos de baixo peso molecular. Uma vez que os anexos fetais estejam formados, a alimentação histotrófica é substituída pela hematotrófica, ou seja, os metabólicos essenciais são adquiridos por meio do sangue materno (NODEN; DE LAHUNTA, 1985). O termo implantação é utilizado habitualmente para indicar a união do trofoblasto com a parede uterina, mas este grau de união varia notadamente entre as espécies (NODEN; DE LAHUNTA, 1985). As superfícies de contato entre os tecidos materno e fetal aumentam a partir do desenvolvimento das vilosidades na superfície do cório. Estas vilosidades apresentam tecido conjuntivo e vasos no seu interior. Nos ruminantes, a sua relação com o endométrio é do tipo vilosa. Em bovinos, a implantação se inicia entre 28 e 32 dias de gestação e finaliza-se entre 40 e 45 dias após a ovulação (NODEN; DE LAHUNTA, 1985).

De acordo com a espécie animal o processo de implantação depende do grau de invasão das células trofoblásticas. A placentação mais invasiva ocorre na placenta do tipo hemocorial, na qual as células trofoblásticas estão em contato direto com o sangue materno. Em bovinos, a placentação é do tipo sinepteliocorial devido à fusão de células trofoblásticas com células do epitélio uterino (DENKER, 1993).

3.2 CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS MONONUCLEADAS

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas são células cubóides que demonstram ser células epiteliais típicas. Estão apoiadas na lâmina basal e conectadas aos complexos funcionais incluindo as junções estreitas (DENT, 1973; WOODING et al, 1994). Estas células constituem aproximadamente 45% da população do trofoblasto (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977). Cada célula trofoblástica mononuclear possui um único núcleo irregular com um único nucléolo grande e uma cromatina finamente dispersa. O citoplasma contém corpúsculos de golgi e pequenos polirribossomos, cisterna do retículo endoplasmático rugoso, com perfis mitocôndriais alongados que são fixados e situados para o ápice da célula (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977). Também no citoplasma podemos evidenciar acumulações de gotas de lipídeos, e vesículas de tamanhos diferentes, alguns contendo material degenerativo (KING et al., 1980). As membranas da superfície apical das células trofoblásticas mononucleadas dão forma aos processos microvilares que interdigitam-se com os processos similares que se elevam das células epiteliais uterinas maternas, formando uma zona materno-fetal de contato (BJORKMAN, 1969; DENT, 1973).

3.3 RESPOSTA MATERNA A IMPLANTAÇÃO DO CONCEPTO

Prenhez da prenhez é o termo utilizado para descrever como a mãe responde fisiologicamente à presença do concepto em seu intervalo reprodutivo. A evolução da placenta foi provavelmente uma das principais maneiras na qual o concepto implantado sinaliza sua presença à mãe (ROBERTS et al., 1997). A falha do concepto em sinalizar sua presença no tempo apropriado conduz à perda da prenhes. Os ruminantes artiodactilos (carneiros, bovinos,

caprinos e cervos) evoluíram meios de salvar ou manter corpo lúteo durante a prenhes adiantada. Este meio de salvar o corpo lúteo parece ser original, a este grupo de mamíferos em que a implantação do embrião é tardia e superficial no início (WOODING, 1992). De acordo com uma revisão feita por Roberts et al., (1999) o corpo lúteo nos ovinos regressa na extremidade de um ciclo estral normal (16 dias pós-estro) em resposta à liberação pulsátil da prostaglandina F_2 (PGF_2) que é produzida pelo endométrio uterino (FLINT, 1995; LAMMING et al., 1995; THATCHER et al., 1995; SPENCER et al., 1996; BAZER et al., 1997; MARTAL et al., 1997). Nos animais domésticos os hormônios produzidos pelo trofoblasto inibem a luteólise e atuam no endométrio materno prevenindo a liberação de $PF_{2\alpha}$ permitindo a implantação do embrião (SPENCER et al., 2004).

3.4 PAPEL NA NUTRIÇÃO FETAL

A placenta é a única via para o transporte de nutrientes ao conceito e o aumento exponencial na demanda, juntamente com o largo alcance causa modificações estruturais (WOODING; FLINT, 1994). A placenta dos ruminantes tem duas regiões principais, a região interplacentomal, envolvida na transferência histotrófica, e a região placentomal, a qual funciona na troca hematopoiética dos nutrientes e metabólicos entre a barreira e o feto (SCHLAFER et al., 2000). Nas áreas interplacentomais, há uma justaposição simples entre a membrana fetal e a epitelial uterina, mas nos placentônios a superfície exhibe criptas carunculares profundas, que são penetradas por longos e profundos ramos vilosos cotiledonares do corioalantóide fetal (DAVIS et al., 2000). Este arranjo resulta em uma área de superfície extremamente realçada entre compartimentos fetal e maternal nos placentônios. Entretanto, as características morfológicas comuns às células do trofoblasto nestas duas regiões incluem a presença dos microvilos na superfície apical das células (KING et al., 1980; GUILLOMONT, 1995), e a presença de complexos juncionais e desmossomos entre as células adjacentes do trofoblasto. Visto que os microvilos fornecem uma área de superfície aumentada para a absorção dos nutrientes, as junções servem para manter o compartimento fetal e materno separados (DENT, 1973).

Assim a placenta comporta-se como uma barreira de baixa permeabilidade que contém mecanismos específicos do transporte de nutrientes e outras substâncias necessárias ao crescimento e metabolismo fetal. As macromoléculas são transportadas através da placenta por difusão ou pela endocitose facilitada (IGWEBUIKE, 2005).

A necessidade fetal de cálcio aumenta exponencialmente durante a segunda metade da gestação quando a formação dos ossos está prosseguindo rapidamente (GRACE et al., 1986). Um outro mecanismo importante para o transporte de macromoléculas para a placenta envolve atividade fagocítica de células trofoblásticas mononucleares. Uma área de fagócitos especializados do trofoblasto é encontrada na aréola dos corioalantóide interplacentomal que governa a abertura de glândulas endometriais. As acumulações microscópicas da secreção uterina das glândulas endometriais nesta região são fagocitadas pelas do trofoblasto (SCHLAFER et al., 2000). Simultaneamente as células mononucleares do trofoblasto do lado fetal dos placentômios são envolvidos na fagocitose de eritrócitos das macromoléculas especiais (BURTON et al., 1976; MYAGKAYA; VREELING-SINDELORAVA, 1976; SANTOS et al., 1996; PEREIRA et al., 2001).

3.5 CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS BINUCLEADAS

Após a implantação do embrião, o epitélio trofoblástico passa a ser constituído por dois tipos morfológicos de células: células colunares trofoblásticas (CCT) e células gigantes trofoblásticas (CGT), (WIMSATT, 1980). As CCT são mononucleadas, com tamanho e aspectos característicos das células epiteliais típicas, situadas em uma lâmina basal e conectadas umas as outras através de complexos juncionais. As membranas apicais dessas células mostram microvilos que interdigitam com os microvilos de células do endotélio uterino, formando a zona de contato materno-fetal (BJÖRKMAN et al., 1968). A maioria das CGT possui dois núcleos, sendo muitas vezes designadas simplesmente de células binucleadas e possuem uma característica morfológica típica de células epiteliais, apresentando grande volume celular, com citoplasma e núcleos (WOODING et al., 1986).

As características estruturais das células gigantes trofoblásticas (CGT) existentes na placenta bovina, em detrimento da observação do número de núcleos, é classificada segundo o volume nuclear total (VNT) das CGT de bovinos (KLISCH et al., 1999). Estabeleceram então três classes de CGT: CGT pequena, com VNT de 400-500 μm^3 , CGT média, com VNT de 700-1200 μm^3 , e CGT grande, com VNT de 1700-2500 μm^3 . Análise morfológica indicou pequenas diferenças na caracterização dos núcleos das CGT pequenas, das CGT médias e das CGT grandes. Algumas CGT pequenas apresentaram a heterocromatina concentrada em uma das duas porções, situadas centralmente no núcleo; outras apresentaram distribuição difusa em toda a área nuclear. Nas CGT de tamanho médio e grande, a heterocromatina estava organizada em muitos cromocentros ligados à membrana nuclear ou distribuída no nucleoplasma. As CGT de tamanho médio mostraram pouco citoplasma e núcleos próximos, enquanto outras possuíam mais citoplasma e exibiam grânulos PAS-positivos. As CGT grandes apresentaram um volume maior de citoplasma, com abundância de grânulos de PAS-positivos.

Ao analisar a ultra-estrutura das células trofoblásticas gigantes binucleadas (CGTB) em búfalos (CARVALHO, 2000) e em bovinos (MORAIS-PINTO, 2002), sugerem que elas não são células totalmente maduras ou passivas, mas sim envolvidas em atividade de síntese. A intensa atividade protéica tem como indicadores o grande número de polirribossomos e mitocôndrias, a abundância do retículo endoplasmático rugoso, o aumento no tamanho do complexo de golgi e a profusão de vesículas citoplasmáticas. As CGTB têm sido também vinculadas à produção de enzimas e à elaboração de hormônios, mas seu complexo comportamento em relação às demais células ainda gera muitas dúvidas (MORAIS-PINTO, 2002). A placenta de búfalos apresenta núcleos das células colunares trofoblásticas (CCT) como grandes e bastante semelhantes entre si, geralmente mostrando nucléolos evidentes (CARVALHO, 2000; MORAIS-PINTO, 2002).

As CGTB apresentaram retículo endoplasmático granular e complexo de golgi mais desenvolvidos que as das demais células trofoblásticas indicando intensa atividade de síntese. Vesículas abundantes presentes por todo o citoplasma, sugerem um processo de exportação de proteínas. Células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) foram vistas no lado materno apresentando as seguintes características nucleares: dois núcleos iguais, com padrões similares aos das CGTB e um terceiro menor, com padrão do núcleo das células epiteliais, o que sugere o

evento de migração das CGTB com posterior fusão ao epitélio uterino (LEE et al., 1986; WOODING, 1992).

Comparando as três fases gestacionais da distribuição das CGTB e da presença dos grânulos PAS-positivos, no período entre o 2º e 3º mês de gestação, as CGTB estavam presentes na camada trofoblástica, com núcleos característicos e fina granulação dispersa pelo citoplasma. Entre o 4º e 6º mês de gestação, as CGTB jovens apresentavam pouca granulação e algumas vezes com características de CGTB maduras com granulação evidente, mas sempre situadas próximas ao ápice da camada trofoblástica. Nesse período, foram observadas, também, células mononucleadas. O período correspondente, entre o 8º e 9º mês de gestação, apresentou CGTB com grande quantidade de grânulos heterogêneos, provavelmente em um dos pólos celulares (CARVALHO, 2000).

As CGTB em placentas de vacas nelore durante sua diferenciação apresentam-se inicialmente arredondadas, aumentando em tamanho e inicialmente desenvolvendo aspectos citoplasmáticos característicos do estágio de maturação. O aumento do volume citoplasmático é acompanhado do aumento dos grânulos contidos no citoplasma. Ao atingir a maturação, as CGTB iniciam um processo de migração rumo ao epitélio uterino na intenção de liberar grânulos nas proximidades dos capilares sanguíneos maternos. Após a degranulação, os núcleos das CGTB tornaram-se picnóticos e entram em degradação. A migração celular se estabelece independente da ocorrência de fusão das CGTB com as células do epitélio uterino, mas quando ocorre a fusão, formam-se células trinucleadas (MORAIS-PINTO, 2002). A população das CGTB e sua migração durante a prenhez, através de junções coriônicas firmes, caracterizam de maneira única a placenta dos ruminantes, sendo um fator determinante para a classificação da placenta bovina como sinepteliocorial (WOODING et al., 1992). Durante a fase de migração das CGTB para a porção materna, estas células desprendem-se do trofoblásto e migram para o epitélio materno onde fundem-se com células epiteliais maternas, lançando produtos hormonais e finalmente degenerando, este processo é característico para a vaca (WOODING; WANTHES, 1980; KLISCH et al., 1999). Logo após o contato fetal por volta do 19º dia de gestação ainda existe separação bem definida entre o epitélio materno e o coriônico da área de adesão, ocorrendo a

presença das CGTB de forma rara e esparsa no epitélio coriônico. Após 21º dia, essas células concentram-se em grupos e já representam 20% das células coriônicas (KING et al., 1982).

Durante a prenhez ocorre uma contínua migração das CGTB em vacas, onde em todos os estágios examinados, as CGTB foram encontradas, em grande quantidade, em posições intermediárias entre o córion e o epitélio materno. Wooding et al., (1980) observaram a distribuição das células trofoblásticas gigantes binucleadas na placenta de bovinos, utilizando um marcador, o ácido fosfotúngstico (AFT), que evidencia os grânulos dessas células. As CGTB compunham cerca de 20% da população total de células do epitélio coriônico em vacas prenhes, entre 37 e 260 dias de gestação. Desses 20% quase todas (80 a 90%) das CGTB estavam inteiramente cercadas por outras células coriônicas uninucleadas, sem conexão com a membrana basal, e o restante delas fez parte da junção microvilar. As únicas organelas realmente visíveis, após a marcação com AFT, nas CGTB, foram os núcleos e os grânulos. Quando as CGTB permaneciam na junção entre o epitélio coriônico e o epitélio uterino, os grânulos assumiam distribuição mais concentrada na parte fetal da célula. As células gigantes trofoblásticas (CGT), no interior do epitélio uterino, ao contrário das anteriores, tinham grânulos voltados para a membrana basal materna (WOODING et al., 1980; LEE et al., 1986).

A comparação entre ovinos e bovinos indicou que, aparentemente, a completa migração das CGTB dentro do epitélio caruncular é menos freqüente em vacas do que em ovelhas. Indicou também que as CGTB em bovinos tendem a localizar-se na interface feto-maternal, onde pode fundir-se com células do epitélio materno em estreita proximidade delas, liberando seu produto no citoplasma das células epiteliais carunculares, sem migrar para o lado materno (LEE et al., 1986). Três teorias foram estabelecidas para a formação das células trofoblásticas gigantes, ao se observar as CGTB e as CGTT presentes na placenta bovina. A primeira teoria estabelece a fusão simples de uma CGTB com uma CCT adjacente, formando uma CGTT com dois núcleos idênticos e um núcleo menor. A segunda possibilidade seria a fusão de uma CGTB com uma célula do endotélio materno, formando o sincício propriamente dito, originando uma CGTT, também com dois núcleos idênticos e um terceiro núcleo menor. A terceira teoria analisa a formação cromossômica dos núcleos, sugerindo uma seqüência de mitose com duplicação cromossômica e cariocinese, sem citocinese correspondente. Assim, uma CGTB sofreria uma

duplicação cromossômica com cariocinese orientada em três pólos de fuso, originando uma CGTT com três núcleos idênticos (KLISCH et al., 1999a, 1999b).

A diminuição das CGTB durante o parto pressupõe uma sequência de eventos que possibilite a ocorrência de destruição das CGTB no tecido fetal e, ao mesmo tempo um aumento na migração das CGTB para dentro do tecido materno, seguido da diminuição destas células na porção materna da placenta. Gross et al., (1991), sugeriram também que a remoção do estímulo para a formação ou produção das CGTB, com ou sem migração reduziria o número total das CGTB em decorrência da não reposição das células. Para avaliar a fragilidade destas células ao término da gestação, as CGTB foram expostas a condições de estresse por salina hipotônica. Foi observada então maior suscetibilidade ao estresse entre as células providas de vacas com parto e expulsão normal da placenta, do que entre as CGTB de outros grupos experimentais. Por outro lado as CGTB de vacas tiveram indução de parto por dexametasona e conseqüente retenção de placenta mostrou maior resistência ao estresse de salina hipotônica do que as CGTB de outros grupos experimentais. Gross et al., (1991) concluíram que durante o parto com liberação normal da placenta, espera-se que ocorra diminuição no número de CGTB presentes no tecido placentário fetal e declínio concomitante na viabilidade destas células *in vitro*.

A produção de prostaglandina e seus derivados, prostaglandina serie E (PGE) e prostaglandina serie F (PGF), no período próximo ao parto causa mudanças na síntese da prostaglandina placentária fetal. Esta produção inicialmente marcada pela presença predominante de prostaglandina da série (E) passa a ser marcada pela presença de prostaglandina da série (F) quando as membranas fetais são liberadas. Uma possível explicação para essa mudança na síntese de prostaglandina seria a da conversão das PGE para as PGF ocorra antes da separação placentária. Sugere-se que a mudança na síntese de prostaglandina (PG) e seus derivados (PGE e PGF) no período próximo ao parto pode ser relacionada ao declínio do número das CGTB (GROSS et al., 1987).

As células gigantes trofoblásticas binucleadas possuem uma estrutura característica completamente diferente das células epiteliais mononucleadas do trofoectoderma circunvizinho. As células binucleadas apresentam aproximadamente 15 a 20% de células trofoectodermicas no início da implantação e durante toda a prenhez no ruminante (WOODING; WANTHES, 1980;

WOODING, 1982). Se aceita geralmente que as células trofoblásticas binucleadas originam-se das células trofoblásticas mononucleadas por mitose citocinética (WINSATT, 1951; BJÖRKMAN, 1968). Toda a célula normal do trofoblasto mononucleada pode originar uma célula binucleada por divisões nucleares consecutivas (WOODING, 1992; WOODING; FLINT, 1994). Durante os estágios adiantados de seu desenvolvimento, as células binucleadas são dispersas aleatoriamente e fixadas profundamente dentro da camada trofoectodermica em posição intra-epitelial, tal qual não fazem nenhum contato com a membrana apical do trofoectoderma (WOODING, 1984; WANGO et al., 1990).

A presença do corpúsculo escuro é devido a numerosos ribossomos citoplasmáticos presentes nas células binucleadas (WANGO et al., 1990). As características ultra-estruturais da célula binucleada madura incluem a presença extensiva da disposição do retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocôndrias pequenas, e grandes corpúsculos de golgi, de grande característica de membrana que limitam os grânulos que ocupam mais de 50% do volume celular (WOODING et al., 1980; WOODING, 1992). A vasta maioria das células binucleadas dos ruminantes contém dois núcleos, mas a presença mononuclear e trinuclear foram relatadas (KLISCH et al., 1999a). Conseqüentemente, estes autores propuseram para as células gigantes trofoblásticas o termo (CGT) para estes três tipos celulares encontradas no trofoectoderma da placenta de ruminantes. Algumas CGT mononucleares exibem lobulação do núcleo, e foi considerado como um sinal que estas células originam mitose abortiva obstruídas antes da conclusão da cariocinese (KLISCH et al., 1999a). A ocorrência de células trinucleadas foi atribuída à mitose citocinética tripolar das células do trofoblasto durante o arranjo dos cromossomos na metáfise é tipicamente em forma de Y (KLISCH et al., 1999a). As células binucleadas não são distribuídas uniformemente no trofoectoderma, mas tendem a ocorrer em pequenos conjuntos (WOODING, 1984). Embora as células binucleadas na região placentomal e interplacentomal da placenta de ruminantes sejam anatomicamente similares, há uma variação regional na expressão do antígeno SBU3 nas células binucleadas nestas duas regiões.

3.6 PAPEL DA IMPLANTAÇÃO DO CONCEITO

Nos ruminantes durante a implantação do conceito ao endométrio maternal e estabelecimento das estruturas da placenta ocorrem três estágios: um período longo de pré-implantação durante o qual o conceito alonga-se consideravelmente; um estágio de justaposição quando os contatos celulares foram estabelecidos entre a camada fetal do trofoblásto e epitélio uterino materno; e um estágio de adesão da estrutura celular da placenta epiteliocorial (GUILLOMONT et al., 1995). O papel da implantação da célula trofoblástica binucleada foi extensivamente estudada em muitas espécies de ruminantes (WOODING et al., 1980; WOODING, 1984; LEE et al., 1986; WANGO et al., 1990). As células binucleadas imaturas residem em uma posição intra-epitelial entre células mononucleadas do trofoblásto. Quando estas células amadurecem grânulos característicos na membrana que limitam seu citoplasma, começam então a migrar para a junção coriônica microvilar com o endométrio materno. Durante a migração, as células binucleadas são capazes de passar através das junções apertadas entre as células adjacentes da célula mononucleada. Esta habilidade da célula binucleada de migrar através das junções sem interromper sua continuidade foi caracterizada por técnicas de crio-fatura em alguns estágios mais atrasados da prenhez nos carneiros (MORGAN; WOODING, 1983). As células binucleadas migram através da relação feto maternal com células colunares do epitélio uterino materno que dá forma a células híbridas trinucleadas (WOODING, 1984; WANGO et al., 1990; WOODING, 1992). Esta capacidade das células binucleadas de migrar e fusionar-se às células epiteliais uterinas maternas têm por resultado a formação de placas sinciciais dando ascensão à classificação da placenta de ruminantes como sinepteliocorial (WOODING, 1992).

3.7 FUNÇÃO ENDÓCRINA DA CÉLULA BINUCLEADA

A fusão da célula binucleada com célula epitelial do endométrio materno gera mecanismos importantes para a exocitose de grânulos da célula binucleada no compartimento materno. Wooding (1984), utilizando o ácido fosfotungico (AFT) que marca os grânulos da célula

binucleada demonstrou que os grânulos característicos da célula binucleada estão em células trinucleadas na porção materna e na placa sincicial, e que logo após a fusão das células, os grânulos corados com AFT fluem para baixo da face materna da célula trinucleada ou da célula sincicial. Assim, as células trinucleadas e as da placa sincicial são polarizadas para depositar os grânulos próximos à circulação materna. Estes grânulos têm hormônios como lactogênio placentário (DUELLO et al., 1986; WOODING; BECKERS, 1987; ANTHONY et al., 1995). No útero bovino, os locais do lactogênio placentário são específicos do epitélio glandular endometrial que expressa receptores de prolactina (STEWART et al., 2000; NOEL et al., 2003). As mudanças na produção deste hormônio são correlacionadas com a morfogênese endometrial da glândula e a produção aumenta a proteína da secreção pelo epitélio glandular durante a prenhez (JOHNSON et al., 2003; SPENCER et al., 2004). Isso implica que o lactogênio placentário pode ter um papel importante na estimulação da morfogênese endometrial da glândula e função diferenciada durante a prenhez nos ruminantes, e isso pode facilitar o crescimento e desenvolvimento fetal. Acredita-se que além do lactogênio placentário, as células binucleadas possam produzir outros hormônios como prolactina relacionada à proteína-1 (ZIELER et al., 1990; KESSLER et al., 1991; ANTHONY et al., 1995), glicoproteínas associadas à gestação (ZOLI et al., 1991; ZOLI et al., 1992; GREEN et al., 2000), estradiol (MATAMOROS et al., 1994) e progesterona (REIMS et al., 1985; WANGO et al., 1991). Estes hormônios são fatores importantes que controlam a carúncula e a morfogênese da glândula uterina, diferenciação e funções necessárias para a nutrição e sobrevivência do feto no útero.

3.8 CONEXINAS

As células são unidades estruturais e funcionais dos organismos vivos, ou seja, todos os seres vivos são formados por células, compartimentos envolvidos por membrana, preenchidos com uma solução aquosa concentrada de substâncias químicas. Há muitos tipos diferentes de células, que variam enormemente em tamanho, formas especializadas, nas quais grupos de células performam tarefas especializadas e são ligadas por um intrincado sistema de comunicação. O conceito de que a célula é a unidade de matéria viva não exclui o fato de que

os organismos multicelulares são constituídos por populações celulares capazes de interagir entre si. Esta interação celular é essencial para a coordenação de atividades; além do que, durante o desenvolvimento, é necessária a propagação de sinais que controlem o crescimento e a diferenciação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997). Atualmente sabe-se que, em um tecido organizado, a maioria das células está conectada por canais de ligação e que elas compartilham uma fonte comum de pequenos metabólitos e íons, os quais podem passar livremente de uma célula para outra. Entretanto, sua individualidade é mantida porque as macromoléculas, incluindo as que carregam a informação genética (DNA e RNA) não sofrem intercâmbio (CRONIER et al., 2001).

Na junção comunicante, as membranas das células estão separadas por dois nanômetros apenas. Cada junção em geral possui a forma circular e é constituída por um conjunto de tubos protéicos paralelos que atravessam as membranas das duas células. Cada tubo é formado pela posição de dois tubos menores, os conexons, pertencentes a cada uma das células vizinhas.

Os canais das junções gap ou nexos são compostos de proteínas transmembranas chamadas conexinas e a mensagem é direcionada de célula a célula através destes canais por meio de um contato específico e direto. As membranas das células comunicantes devem oferecer meios de estabilizar as interações para assegurar que as mensagens sejam corretamente entregues durante o tempo necessário para o destinatário correto. As moléculas responsáveis pela adesão e reconhecimento intercelular também podem estar envolvidas em tal mecanismo de controle de comunicação. Além disso, a diversidade das proteínas que compõem a família das conexinas também pode contribuir para o ajuste fino do processo de transferência de mensagens através das junções gap (BRUZZONE et al., 1996; YAMASAKI; NAUS, 1996).

A diversidade da família conexina foi sugerida, pela primeira vez, através de análises bioquímicas de frações subcelulares ricas em junções comunicantes. Estes estudos identificam preponderantemente bandas polipeptídicas que, de acordo com o tecido de origem e o método de preparação, exibiam uma massa molecular variando entre 16-70 kDa (GROSS et al., 1983; NICHOLSON et al., 1997; BUULTJENS et al., 1988; GOODENOUGH et al., 1996). Estudos mais

recentes, com purificação das áreas de junções comunicantes e avaliação de DNA, identificaram mais de 18 membros dessa família, bem como a distribuição destes em células e tecidos específicos (SHIBATA et al., 2001).

A nomenclatura (Cx) com base nas espécies de origem, em conjunto com a massa molecular definida pela seqüência do código de DNA. Por exemplo, a proteína 43-Kda, primeiramente identificada em junções comunicantes miocárdiais é designada como Cx43; a conexina homóloga vinda de diferentes organismos, podem ser distinguidas com um prefixo de identificação próprio. A identificação de conexinas com massas moleculares muito próximas tem sido feita através do uso de massa decimal. Este sistema permite a identificação não ambígua de cada membro, mas não é completamente ilustrativa (BRUZZONE et al., 1996). As duas voltas extracelulares contêm três partículas de cisteína, em uma sucessão característica. Esta bem demonstrada que as partículas de cisteína formam conexões dissulfídicas intramoleculares, mas não intermoleculares, ligando duas voltas da Cx32 e da Cx43. Este evento acontece no retículo endoplasmático, e é razoavelmente espetacular que esta característica estrutural seja comum a todas as conexinas (BRUZZONE et al., 1996). Os segmentos transmembrânicos e as porções citoplasmáticas curtas a N-terminal ficam também bem preservadas entre diferentes conexinas, embora os principais domínios citoplasmáticos sejam únicos em seqüência e comprimento (BRUZZONE et al., 1996).

As conexinas são proteínas de membrana que formam canais intercelulares estabelecendo um tipo de comunicação direta pela qual as células vizinhas sincronizam seu metabolismo. As junções comunicantes chamadas também de junções em fenda, junções “gap” ou nexos, são canais que comunicam os citoplasmas de células epiteliais adjacentes, permitindo que grupos celulares funcionem de modo coordenado e harmônico, formando um conjunto funcional.

Segundo Bruzzone et al. (1996) diferentes tecidos podem expressar diferentes tipos de conexinas, ou mais de um tipo de conexina, no mesmo tipo celular, sendo que conexinas diferentes podem estar colocalizadas no mesmo hemicanal (conexon heteromérico) ou junção (canal heterotípico).

As conexinas são codificadas por uma família de multigenes que consiste em pelo menos 16 membros. A maioria das células expressa múltiplos tipos de conexinas que podem associar-se para formar junções comunicantes potencialmente contendo mais de um tipo de conexina ou permeabilidade. A idéia de comunicação de célula a célula habilita diretamente a transmissão de sinais de regulação entre células em desenvolvimento, por um caminho que é mediado através de junções comunicante, proposto por Potter et al. (1966) depois de descobrir que todas as células no embrião podem comunicar-se entre si. As células podem trocar moléculas citoplasmáticas de pequeno tamanho e íons inorgânicos através das junções gap. Embora existam outras maneiras pelas quais elas possam comunicar-se, a junção gap fornece uma interação imediata e individualizada entre o ambiente citoplasmático de células vizinhas (BRUZONE et al., 1996; STEINBERG, 1998).

Na maioria dos tecidos, as células se prendem umas às outras através de modificações de suas membranas, conhecidas coletivamente como junções celulares. Muitas vezes a função principal dessas estruturas é apenas a aderência entre as células, como o que acontece com os desmosomas e as *zonulae adherentes*; outras vezes seu papel é vedar o espaço intercelular, impedindo o trânsito molecular extracelular de tal modo que a passagem tem que ser feita por via intracelular e, portanto, sob o controle das próprias células. A especialização da membrana para construir esta estrutura de vedação chama-se junção oclusiva ou zonula occludens. Há também em alguns locais mais restritos, modificações na membrana celular adjacente que permite a passagem de uma célula para a outra de íons e moléculas pequenas, que transferem informações através de sinais químicos, integrando a atividade de conjuntos celulares. Estes conjuntos apresentam acentuada unidade funcional, porque todas as células respondem aos estímulos (hormonais e nervosos) recebidos, mesmo que estes estímulos sejam captados por apenas algumas células do conjunto.

A junção comunicante intercelular coordena atividades celulares durante o processo de desenvolvimento e diferenciação e sua deficiência orgânica ou mutação de genes de conexinas foram implicadas dentro de processos patológicos (CRONIER et al., 2001). As alterações na estrutura das conexinas causadas por mutações podem perturbar tanto a formação das junções comunicantes (JC) como o controle da proliferação celular por um efeito dominante negativo

(DUFLOT-DANCER et al., 1997; OMORI et al., 1997). A expressão ou distribuição de conexinas em tecidos sob algum processo patológico geralmente está alterada, como é o caso da cirrose hepática, onde há uma redução das junções comunicantes. Sabe-se atualmente que a ausência de comunicação intercelular mediada pelas junções gap (GJIC) entre as células cancerosas (comunicação homóloga) ou entre as células saudáveis e as cancerosas (comunicação heteróloga) é importante na expansão clonal do câncer (YAMASAKI, 1991).

Foi efetivamente demonstrado que a restauração da comunicação homóloga ou mesmo da heteróloga apresenta efeitos supressores de tumores (MEHTA et al., 1986; YAMASAKI; KATOH, 1988; MESNIL et al., 1995). As expressões de múltiplas conexinas no blastocisto podem preparar o conceito implantado durante a gastrulação e desenvolvimento da placenta (KIDDER; WINTERHAGER, 2001). A comunicação de célula a célula dentro das subpopulações de trofoblasto responsável pela invasão, crescimento da placenta e transporte materno-fetal é de interesse especial porque se acredita que canais intercelulares coordenam proliferações e processos de diferenciação (WINTERHAGER et al., 1999).

Normalmente por ocasião do parto, a vaca libera as membranas fetais da placenta em torno de três a oito horas após a expulsão do feto (ROBERTS, 1971). Não são incomuns a ocorrência de atraso no processo de liberação da placenta com subsequente retenção da mesma, sendo esta uma das alterações puerperais mais frequentes em vacas leiteiras (SCHEIDEGGER et al., 1993). Durante a gestação ocorrem mudanças estruturais no placentônio que estão relacionadas à subsequente liberação normal da placenta (BJÖRKMAN; SOLLEN, 1960; WILLIAMS et al., 1987; MARQUES JR., 1988; BARRETO FILHO; MARQUES JR., 1993).

A diminuição do número de células epiteliais ao final da gestação é um aspecto importante no processo de maturação da placenta e subsequente separação entre os tecidos materno e fetal (GRUNERT, 1986). Os mecanismos fisiológicos que determinam este processo não estão esclarecidos, mas possivelmente ocorre um processo de degeneração gradativa destas células ao longo da gestação (WAGNER, 1989). Vacas leiteiras com liberação normal de placenta após o parto apresentam menor número de células binucleadas, nos casos de retenção

placentária observou-se que o número de células binucleadas era maior (WILLIAMS et al., 1987).

O citotrofoblasto apresenta-se bem caracterizado a partir do 80º dia de gestação onde grandes quantidades de células binucleadas são observadas na periferia do vilo em íntimo contato com o epitélio caruncular uterino. Dos 90 aos 240 dias de gestação pode-se notar o aumento considerável da vascularização. As células binucleadas começam a diminuir em número, mas não interrompe o seu processo de formação. Dos 60 aos 120 dias de gestação as células binucleadas são abundantes e estão posicionadas junto à linha de junção materna fetal. Aos 120 dias de gestação as células uninucleadas fetais parecem estar mais bem caracterizadas. As células binucleadas decrescem em número discretamente, tanto seu citoplasma quanto seus núcleos sofrem discreta diminuição indicando o início do processo degenerativo. Dos 150 aos 210 dias de gestação o processo de degeneração das células torna-se evidente iniciando uma redução progressiva dessa população celular. Nesta fase, as células binucleadas mostram tendência de se fundir ou com o epitélio uterino ou com células uninucleadas fetais formando células trinucleadas. Aos 240 dias de gestação o desenvolvimento capilar é bastante acentuado em quase todo espaço mesênquimal do ciclo fetal (MORAIS-PINTO, 2002). A população de células binucleadas está consideravelmente reduzida, em contrapartida, células trinucleadas aparecem com maior frequência oriunda ou da fusão de uma célula binucleada ou uma célula uninucleada ou como resultante da fusão entre célula binucleada e célula uninucleada caruncular uterina. As células binucleadas iniciam sua diferenciação dentro do trofoectoderma fetal. Estão situadas profundamente no mesênquima, mas à medida que amadurecem elas se aproximam da linha de junção e as mais altamente diferenciadas usualmente permanecem nesta superfície interdigitadas com as células epiteliais uterinas (MORAIS-PINTO, 2002). Podemos caracterizar dois grandes momentos na dinâmica celular das células trofoblásticas binucleadas: o primeiro é o incremento na formação de novas células binucleadas bem evidenciado em torno do 60º dia de gestação; o segundo é o “start” no processo degenerativo dessa população de células a partir do 150º de prenhez. A degeneração de células binucleadas é um processo que ocorre em todas as fases da gestação, mas em torno do 150º dia 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 o

seu aspecto granular. A membrana plasmática também tem seu contorno alterado (MORAIS-PINTO, 2002).

3.9 CONEXINAS EM PLACENTA

A estreita relação entre o desenvolvimento da placenta e o feto torna importante o entendimento das formas de crescimento e diferenciação placentária. As junções comunicantes e a comunicação intercelular mediada por junções são conhecidas por seu envolvimento no processo de diferenciação de vários tecidos. Diante disso, vamos analisar alguns trabalhos que em muito contribuíram para a elucidação do papel das junções comunicantes e da família de conexinas no processo de implantação.

3.9.1 Conexinas e canais de comunicação intercelular

As junções comunicantes aumentam pela presença da hCG. Pode seu aumento ser um critério fisiológico para definir o início da fusão e a subsequente formação do sincício (FIRTH et al., 1980). A camada de células gigantes na placenta humana no início da prenhez (7º a 12º) analisada através de imunofluorescência para conexinas 32 e 43, hCG e hPL evidenciaram dois tipos celulares na camada de células gigantes. O primeiro tipo celular tem muitos núcleos evidentes e citoplasma volumoso. O segundo tipo tem células mononucleadas agregadas em íntima justaposição aos estreitos espaços intercelulares. As verdadeiras células gigantes multinucleadas não apresentam junções comunicantes, mas muitas organelas no citoplasma e imunofluorescência positiva para hPL e hCG, grande atividade de síntese de proteínas. Marcações de Cx43 foram vistas no estroma decidual, entre células epiteliais de glândulas endometriais (AL-LAMKI et al., 1999; CARVALHO, 2004; PFARRER et al., 2006).

3.9.2 Hipóteses para formação de CGT

A comunicação de célula-a-célula favorece trocas citoplasmáticas ou formação de gradientes morfogenéticos. A ausência de junções comunicantes em células isoladas insinua um processo de internalização, seguido de coalescência. A comunicação intercelular na placenta humana nos vilos trofoblásticos e extravilos trofoblásticos observados para Cx43 é evidenciada como pontos nos limites celulares e em zonas perinucleares associadas a golgi, após a fusão celular passaram a apresentar no interior do citoplasma (AL-LAMKI et al., 1999). Todas as conexinas testadas *in situ* pela imunofluorescência e microscopia confocal apenas a Cx43 foi detectada entre células trofoblásticas na placenta do primeiro trimestre (CRONIER et al., 2001).

Durante a pré-implantação de embriões de ratos e camundongos a expressão de múltiplas conexinas é característica comum de roedores (Cx30, Cx31, Cx43, e Cx45) com exceção da Cx26. A Cx26 pode estar correlacionada a variação fisiológica entre as duas espécies de roedores. A expressão de múltiplas conexinas é uma condição prévia para a segregação rápida de diferentes tipos de canais intercelulares dentro do tecido embrionário e nas regiões extra-embrionárias (HOUGHTON et al., 2002).

Após 12 horas de cultivo de células trofoblásticas humanas para observação da expressão da Cx43 por imunofluorescência entre células citotrofoblásticas, foi observado que células vizinhas iniciaram contato através de emissão de protusões e pseudópodos, e mais tarde, grupos de células citotrofoblásticas apresentaram estreita oposição e após 24 horas a imunofluorescência da Cx43 localizou-se na região intercelular entre pseudópodos de células vizinhas, e 48 horas após nos limites intercelulares ocorreu a fusão celular, desaparecendo a Cx43 da membrana celular e tornando a aparecer em locais intracitoplasmático, e já com 72 horas a célula apresentava grande massa celular e núcleo central expandido (CRONIER et al., 2002).

Al-lamki et al. (1999) estudaram a ultra-estrutura da camada de células gigantes na placenta humana no início da gravidez, da sétima a décima segunda semana gestacional, caracterizando sua natureza por imunofluorescência de marcadores para citoqueratina e conexinas (Cx32 e

Cx43), hormônios como (gonadotrofina coriônica humana-hCG e lactogênio placentário humano – hPL). Seus resultados evidenciaram dois tipos celulares na camada de células gigantes, sendo o primeiro tipo formado por células com muitos núcleos evidentes e citoplasma volumoso e o segundo por células mononucleadas agregadas em íntima justaposição aos estreitos espaços intercelulares. As células agregadas ligavam-se através de desmossomos e apresentavam junções comunicantes evidenciadas pela reação de imunofluorescência para Cx32 e Cx43. Contrastando com esse resultado, as verdadeiras células gigantes multinucleadas não apresentaram junções comunicantes, mas sim muitas organelas no citoplasma e imunofluorescência positiva para hPL e hCG, sugerindo grande atividade na síntese de proteínas. Fortes marcações de Cx43 foram vistas também no estroma decidual, confirmando outros estudos que haviam identificado no endométrio de rato durante o início da prenhez. A Cx32 pôde ser vista em menor quantidade no estroma decidual, mas pôde ser identificada entre células epiteliais de glândulas endometriais. Embora existam várias hipóteses para a formação das células gigantes, os autores confirmaram, através de marcadores imuno-histoquímicos, a origem trofoblástica destas células, considerando que na formação do sincício possa ocorrer também uma fusão com células maternas. De fato, a característica morfológica mais importante desse estudo foi detectar a presença de junções comunicantes entre as células mononucleares participantes dos agregados celulares, sugerindo um potencial de comunicação célula-a-célula que favoreceria trocas citoplasmáticas ou a formação de gradientes morfogenéticos. A presença de funções comunicantes nas células trofoblásticas dentro dos agregados, e sua ausência nas células trofoblásticas gigantes isoladas insinuaram um processo de internalização, seguido de coalescência das células individuais.

3.10 A PLACENTA BOVINA E SUA MATURAÇÃO

Durante a gestação são formados entre 70 a 120 carúnculas no endométrio bovino (MARQUES JÚNIOR; BARRETO FILHO; SATURNINO, 1993). As carúnculas compõem as partes maternas da placenta, sendo recobertas pelas membranas que crescem e se expandem para dentro do lume uterino, formando estruturas fetais irregulares, que são conhecidas como

cotilédones (SCHAFLER; FISHER; DAVIS, 2000). Os componentes fetais se constituem de endotélio, mesênquima e trofoblasto. Os maternos são epitélio uterino, tecido conjuntivo e endotélio (RAMSEY, 1982). Entre os cotilédones ha áreas de tecido coriônico liso (RAMSEY, 1982). Assim, a placenta bovina é classificada como cotiledonária (WOODING, 1992), epiteliocorial ou sinepteliocorial, vilosa; não decídua, porque as partes materna e fetal podem ser separadas sem causar danos à mucosa uterina após o parto (BJÖRKMAN, 1970; STEVEN, 1975).

Com o crescimento placentário, os cotilédones projetam vilos coriônicos que se interdigitam com as criptas carunculares formando a unidade funcional da placenta, o placentônio (AMOROSO, 1952; STEVEN, 1975). Essas interdigitações aumentam a superfície de contato entre o tecido fetal e materno (STEVEN; MORRIS, 1975). Segundo King, Atkinson e Robertson (1982), com a invaginação dos vilos, os placentônios crescem aproximadamente cinco mil vezes, envolvendo próximo ao parto. Vilos coriônicos são cones mesenquimatosos vascularizados, revestidos por células trofoblásticas cuboidais ou células principais mononucleadas e células gigantes com dois ou mais núcleos (BJÖRKMAN, 1970; JAINUDEEN; HAFEZ, 1993). As células trofoblásticas cuboidais mononucleadas possuem núcleos arredondados com grandes nucléolos. As células gigantes possuem núcleos esféricos, amplamente separados, com nucléolos evidentes e citoplasma abundante. O epitélio da cripta uterina é cubóide ou achatado. Suas células possuem núcleos esféricos e nucléolos bem evidentes (BJÖRKMAN, 1969).

Durante a gestação, as células binucleadas coriônicas migram do epitélio coriônico para fundir-se com as células epiteliais uterinas. Essa função origina células materno-fetais híbrido, explicando a classificação em placenta sinepteliocorial (WOODING, 1992). A liberação após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação do placentônio. As contrações uterinas durante o parto ajudam mecanicamente a eliminação placentária. Um fator determinante na liberação é a desagregação da vilosidade materno-fetal (BJÖRKMAN, 1969). O processo de maturação placentária envolve o achatamento do epitélio nas carúnculas maternas, que é intensificado três e cinco dias antes do parto (GRUNERT,

1984) e a diminuição do número de células binucleadas do trofoblasto e células epiteliais das carúnculas maternas (WANGO; HEAP; WOODING, 1992; SANTOS, 1995). O feto aparentemente participa da manutenção da população de células binucleadas (WOODING, 1992) e as alterações hormonais antes do parto parecem favorecer a diminuição dessas células nas criptas carunculares declinando a partir dos 270 dias de gestação (WOICKE et al., 1986; BARRETO FILHO; MARQUES JÚNIOR, 1993). A redução no suprimento sanguíneo das carúnculas maternas e da circulação placento-fetal ajuda na desagregação feto-maternal após o parto. As vilosidades coriônicas tornam-se menos aderidas às criptas carunculares devido aos períodos alternados de hiperemia e isquemia e as enzimas proteolíticas, tais como a collagenase, diminuem a adesão da matriz extracelular na interface materno-fetal (JEFREY; EHLICH; ROSWIT, 1991). A liberação fisiológica da placenta ocorre geralmente entre três a seis horas após o parto. A proteólise do cotilédone e a diminuição da adesividade na interface carúncula-cotilédone resultam na liberação da placenta. As collagenases são capazes de reduzir a viscosidade específica do colágeno. A atividade dessas enzimas durante a liberação da placenta é aumentada nas vilosidades de vacas saudáveis e diminui em vacas com retenção placentária (GROSS; WILLIAMS; MANSPEACKER, 1985).

A progesterona é a antagonista direta das contrações uterinas induzida tanto pela ocitocina quanto pelas prostaglandinas. No dia anterior ao parto as concentrações plasmáticas de progesterona caem acentuadamente (HAFEZ; JAINUDEEN, 1995). Na semana anterior ao parto, há aumento rápido nas contrações do cortisol fetal, que inibe gradualmente a síntese de progesterona pelo útero e placenta (HUNTER et al., 2003) e induz a produção de estrógenos (HOFFMANN et al., 2002; MCDIARMID, 1983). Cerca de sete dias antes do parto há aumento de abrupto das concentrações plasmáticas de estrógeno (CHEW et al., 1977).

O aumento de estrógeno e a diminuição de progesterona no final da gestação estimulam a secreção de PGF2 α (LINDELL; KINDAHL; EDQVIST, 1977) que começa a aumentar 24 a 36 horas antes do parto atingindo pico no momento do mesmo (GOFF; HORST, 1997). A PGF2 α causa luteólise (KORDTS; JOCHLE, 1975; LEWING; PROULX; MAPLETOFT, 1985),

aumenta o número de receptores para ocitocina e inibe a síntese de progesterona no útero (GOFF; HORST, 1997).

Segundo Gross, Willians e Moreland (1986), a administração de PGF2 α uma hora antes do parto previne a retenção de placenta. As células binucleadas dos vilos coriônicos são a principal fonte de produção de prostaglandinas na placenta, a partir do ácido araquidônico (GROSS; WILLIAMS, 1986). Com o aparecimento das contrações uterinas há a compressão mecânica dos placentônios induzindo o relaxamento das vilosidades coriônicas o qual favorece o desprendimento dos cotilédones (CHALLIS; LYE, 1994). Em seguida, com a presença de contrações abdominais, o feto é forçado para o interior da pelve e os placentônios são comprimidos contra o feto pela pressão da parede abdominal e contrações uterinas. Após a expulsão do feto o fluxo sanguíneo umbilical é interrompido. Com isso há isquemia dos vilos coriônicos e contração dos capilares facilitando a separação entre os vilos e as criptas. Nesse estágio, as contrações uterinas diminuem de amplitude, mas permitem a liberação da placenta (HAFEZ; JAINUDEEN, 1995).

Segundo Woicke et al. (1986), distúrbios no processo de maturação podem resultar na retenção placentária. Esses autores demonstraram experimentalmente que vacas com parto normal apresentavam o epitélio materno descontínuo com intenso achatamento e diminuição do número de células maternas. Por outro lado, animais com retenção apresentaram o epitélio das criptas carunculares contínuo e com células cuboidais, indicando ausência de maturação. A retenção de placenta ou retenção das membranas fetais é conceituada como ausência da separação da carúncula materna (retenção primária), ou a dificuldade mecânica em expelir a membrana fetal já separada (retenção secundária) (EILER, 1997).

Em bovinos, a recuperação do trato reprodutivo no período pós-parto permite o aumento da eficiência reprodutiva e conseqüentemente melhor desempenho da atividade pecuária. A expulsão placentária no tempo normal e a adequada involução uterina possibilitam, juntamente com outros fatores, o retorno à atividade ovariana luteínica cíclica pós-parto. Com isso há um rápido restabelecimento do ambiente uterino para uma nova gestação (MARTINS, 1999a).

É difícil definir precisamente a retenção patológica da placenta considerando o tempo decorrido após o parto (LAVEN; PETERS, 1996). As escalas de tempo usadas variam entre 6 a 71 horas (VAN WERVEN et al., 1992). Segundo Eiler (1997), os efeitos danosos à performance reprodutiva e à produção de leite, doença pós-parto e taxa de abate são principalmente detectadas quando a retenção excede o período de 12 horas. A incidência da retenção placentária em bovinos é muito variável, pois depende de como é definida e do país de origem (LAVEN; PETERS, 1996). Segundo Pasley, Mikelsen e Anderson (1986) ela normalmente varia de 3 a 12%. Em alguns países subdesenvolvidos a incidência pode chegar a 30% (ex: Bangladesh) (PUTRO, 1988; SAMAD; RAHMAN; ISLAM, 1989). A retenção placentária ocorre com frequência em vacas leiteiras levando a transtornos reprodutivos no período pós-parto. Os efeitos da RP na fertilidade podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. O principal efeito direto da RP é o aumento no intervalo entre partos (ERB et al., 1981; BORSBERRY; DOBSON, 1989). Os efeitos indiretos da RP na fertilidade estão associados com o desenvolvimento de metrite (CURTIS et al., 1985). A placenta retida é isquêmica, hipóxica e carente de nutrientes. No entanto, ela continua metabolicamente ativa por vários dias. Na presença de estresse metabólico, liberam-se mediadores bioquímicos que causam imunossupressão no útero (PGE_2), aumento da permeabilidade vascular (histamina e prostaglandina), aumento da atividade lisossômica (proteólise), danos endometriais (liberação de histaminas por mastócitos) e redução da quimiotaxia e migração de leucócitos. A associação desses fatores pode levar a metrite e à conseqüente diminuição da fertilidade (EILER, 1997).

Segundo Holm, Salvatore e Zeek-Mining (1964), a gestação prolongada pode levar à RP por ocasionar mudanças proliferativas no epitélio caruncular que, mecanicamente, impediriam a liberação da placenta. Da mesma forma, por deficiência mecânica de liberação, a placentite e a cotiledonite podem favorecer a RP. Metrite aguda pós-parto pode levar à inércia uterina RP e placentite (LAVEN; PETERS, 1996).

3.11 APOPTOSE

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular ativa que requer energia, síntese e degradação protéica (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Trata-se de um mecanismo fisiológico de controle celular que regula o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (VASCONCELOS, 1995). Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenham papel importante na função placentária. Ambos os processos são inversamente proporcionais ao longo da gestação (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003). Segundo Smith, Baker e Symonds (1997), a apoptose atinge células de todos os tipos na placenta humana. A sua ocorrência aumenta consideravelmente no terço final da gestação (SMITH; BAKER; SYMONDS, 1997; BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003). Nesse caso, a apoptose parece estar relacionada com o mecanismo de remodelação placentária auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais (SMITH; BAKER; SYMONDS, 1997).

Fisiologicamente a apoptose possibilita a eliminação de células desnecessárias a fim de se manter a homeostase tecidual (WÖHRL; HÄCER, 1999). Nos momentos que antecedem o parto a placenta precisa já estar hipocelularizada para que seja liberada normalmente (BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993). Vacas com retenção placentária apresentam um aumento de células epiteliais maternas (SANTOS; MARQUES JÚNIOR, 1998). Estudos morfológicos demonstraram que há maturação da população celular do tecido fetal e materno do placentônio (MARQUES JUNIOR, 1988; BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993; SANTOS, 1995; MALARD et al., 1996; SANTOS, MARQUES JÚNIOR; BARRETO FILHO, 1997) e com ocorrência de apoptose (MARTINS, E. 1999; MARTINS, V.M.V., 1999; NUNES et al., 2000a, 2000b). A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para maturação, quanto para liberação normal da placenta após o parto (MARTINS, E., 1999; MARTINS, V.M.V., 1999; NUNES et al., 2001; MARTINS et al., 2004). Martins (1999a) supôs que as mudanças hormonais envolvidas com o parto estimulariam a apoptose nas células trofoectodermicas e maternas, uma vez que a apoptose é mais intensa no momento do parto. Além disso, observou-se que o número de células

apoptóticas em placentônios de vacas que pariram e liberaram normalmente a placenta foi significativamente maior do que nas que tiveram parto atermo com retenção placentária.

Os macrófagos presentes na placenta retida apresentam a mesma distribuição que na placenta normal, porém sua atividade de fosfatase ácida é reduzida em relação à placenta não retida. Esses macrófagos poderiam estar desempenhando um papel de células de limpeza dos corpos apoptóticos na placenta não retida, daí estarem mais ativos. Por outro lado, como a placenta retida apresenta um número menor de células em apoptose, o grau de atividade dos macrófagos seria menor (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O material utilizado no experimento foi obtido de fêmeas bovinas, com prenhez comprovada, sem padrão de raça definida. Os placentônios coletados foram fornecidos pelo frigorífico Mantiqueira, localizado na cidade de São José dos Campos, interior do estado de São Paulo.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

Após o abate dos animais as carcaças foram introduzidas na linha de abate, no momento da evisceração, procedeu-se então à retirada dos úteros gestantes, através de incisão longitudinal na curvatura maior do corno uterino, para exposição do feto e dos placentônios. Após exteriorização, o cordão umbilical foi seccionado, o feto colocado em decúbito lateral e o período gestacional avaliado a fim de se estimar a idade dos mesmos segundo o padrão de crescimento fetal, estabelecido pelo comprimento equivalente à distância cefalococcígea, de acordo com a fórmula de Hetzel, citado por Mies Filho (1987) (Tabela 1).

Os placentônios foram coletados de fêmeas gestantes aparentemente em boas condições de saúde e sem histórico de doença reprodutiva, com idades de gestação variando entre 30 dias (fase em que o blastocisto já se encontrava completamente implantado) e 260 dias (próximo do termo). Objetivamos preferencialmente novilhas e vacas de primeira cria na certeza de ter sido minimizado ao máximo as possibilidades de interferências hormonais e outros agentes causadores de retenção placentária.

Tabela 1 - Demonstração da evolução do período gestacional através das medidas de comprimento dos fetos, obtidas da crista nual a primeira vértebra coccígea

TEMPO GESTACIONAL DE FETOS BOVINOS

Mês de gestação	Mês de gestação x (Mês de gestação + 2)	=	Medida do feto
1º	1 x (1 + 2)	=	3 cm
2º	2 x (2 + 2)	=	8 cm
3º	3 x (3 + 2)	=	15 cm
4º	4 x (4 + 2)	=	24 cm
5º	5 x (5 + 2)	=	35 cm
6º	6 x (6 + 2)	=	54 cm
7º	7 x (7 + 2)	=	63 cm
8º	8 x (8 + 2)	=	80 cm
9º	9 x (9 + 2)	=	99 cm

Fonte: Mies Filho, (1987).

As amostras de cultivo celular foram divididas em três grupos considerando o tempo gestacional a que pertencem. As células em cultivo do grupo I, correspondem ao primeiro terço da gestação, entre 35 e 90 dias, com comprimento dos fetos entre 0 e 15 cm; o grupo II corresponde ao segundo terço gestacional, entre o quarto e sexto mês de gestação, entre 91 e 180 dias, fetos entre 16 e 53 cm de comprimento em média; o grupo III corresponde entre o sétimo e nono mês de gestação que vai de 181 a 270 dias e apresenta fetos com comprimento entre 54 e 99 cm (Figura 1).

Figura 1 - Fotografias dos três terços gestacionais. (A) fotografia de um feto no primeiro terço gestacional; (B) fotografia de um feto no segundo terço gestacional; (C) fotografia de um feto no terceiro terço gestacional; (D) fotografia de um placentônio do terceiro terço gestacional. (barra = 20 μ m)

4.2 COLETA DE TECIDOS

Placentônios de animais dos três grupos gestacionais foram coletados da região dorsal e ventral do útero. Esses úteros antes de abertos foram aspergidos com álcool 70 GL, os placentônios logo após a coleta foram lavados três vezes em solução PBS 0,1 M, pH 7,4 estéril por cinco minutos, os placentônios então foram acondicionados em sacos plásticos contendo a mesma solução e transportados a 4⁰C ao Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica, do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS

No laboratório os procedimentos ocorreram em condições estéreis no fluxo laminar. Os placentônios foram lavados em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 na concentração de 0,1 M, e em seguida, colocados sobre uma placa de petri para a retirada do excesso do epitélio cório alantóide através de pinça e tesoura esterilizadas. Os placentônios foram então seccionados em vários sentidos com espessura de 0,5 cm com lâmina de bisturi e colhidos os fragmentos da região da interface entre o cotilédone e a carúncula em várias regiões dos placentômios, para homogeneizar a amostra. Os fragmentos foram colocados sobre uma peneira de malha fina de 150 mesh acomodada sobre um becker contendo 2 ml de meio de cultura D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Fetal Bovine Serum); 1U/mL de penicilina; 1µg/mL de estreptomicina; 2,5µg/mL de anfotericina; 0,02 mL de L-glutamina 0,3%; 0,05 mL de HEPES 280 mM e 0,005 mL de NaHCO₃ 7,5%. O tecido foi levemente pressionado com movimentos circulares contra a peneira com o auxílio de um êmbolo de seringa de 3 ml, promovendo a separação celular e realizando-se constantes lavagens com D-MEM para o recolhimento das células separadas. Esta suspensão celular foi transferida para um tubo falcon de 50 ml, contendo 40 ml de suspensão celular seguida de lavagem em três ciclos de 550 g por 5 minutos a 20°C. Após a tríplice lavagem eliminou-se o sobrenadante, tendo então como resultado ao fundo do tubo falcon um aglomerado de células “pellet” que foi re-suspenso em volume adequado de D-MEM e procedeu-se à análise da viabilidade celular.

4.4 CULTURA CELULAR

Durante o experimento testamos também três técnicas com os seguintes protocolos para fixação de células: a) utilizamos uma placa de petri contendo uma camada de gelatina ao fundo para permitir maior aderência das células a placa; b) as células trofoblásticas foram mantidas sobre lamínulas de vidro acondicionadas ao fundo da placa de petri; c) o cultivo celular foi feito adicionando-se a suspensão celular diretamente sobre a placa de polietileno (FALCON[®]) sem gel

com 60 mm de diâmetro. Todas as placas continham suspensão celular e foram acondicionadas em incubadora à temperatura de 37° C e atmosfera gasosa de 5% de Co₂ em D-MEM com 10% de SFB pelo período de 5 dias.

4.5 CONTAGEM DA VIABILIDADE CELULAR

Após a extração das células analisamos a viabilidade celular utilizando o método de exclusão por azul de tripan e concentração celular para obtenção de uma suspensão contendo de 2×10^7 células/ml. A contagem celular foi realizada utilizando-se um hematocítômetro. As células foram cultivadas em placas de poliestireno com um poço cada, contendo cerca de 2×10^7 células/ml em D-MEM em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido período de 24 horas o meio de cultura foi trocado e a cada intervalo de cinco dias, as culturas foram mantidas por até 10 dias, estabelecendo-se um protocolo de manutenção de células placentárias.

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após cinco dias de cultivo celular as placas foram retiradas da incubadora, todo o material sobrenadante e meio de cultura foram descartados, permanecendo apenas as células aderidas ao fundo da placa (Figura 2). Estas células foram então fixadas com solução de formaldeído obtido a partir do paraformaldeído a 4% em tampão (PBS), fosfato pH 7,4 na concentração de 0,1 M, por 10 minutos, após este período a solução de formaldeído foi retirada e realizada tríplice lavagem com solução de PBS 1X por 5 minutos.

Em seguida bloqueou-se a peroxidase endógena com três banhos com solução de água oxigenada (H₂O₂) por 10 minutos, após a retirada da peroxidase endógena realizou-se adição de solução tampão TNB (Blocking buffer, Kit Nel 700; Perkin Elmer Life Sciences, Inc. Boston,

MA) por 30 minutos ao abrigo da luz e posteriormente tríplice lavagem com solução de PBS 1X por 5 minutos. Após estes procedimentos aplicou-se anticorpo primário na concentração de 1:800 (anticorpo: PBS), e incubação por 24 horas em câmara úmida a temperatura de 4°C.

Foram testados três protocolos para definição do tempo adequado para incubação do anticorpo primário (12, 24, e 48 horas) em câmara úmida a 4° C.

Figura 2 - Fotografias do quinto dia de cultivo de células placentárias bovina. (A) cultura de células placentárias bovinas do primeiro terço gestacional; (B) cultura de células placentárias bovinas do segundo terço gestacional; (C) cultura de células placentárias bovinas do terceiro terço gestacional. Objetiva 20X – (barra: 10 μ m.)

Decorridas 24 horas de incubação foi retirado o anticorpo primário, e então novamente realizada tríplice lavagem com solução de PBS 1X por cinco minutos. Em seguida adicionou-se o anticorpo secundário. A revelação da reação imuno-histoquímica foi realizada com a utilização de anticorpo secundário (anticorpo biotilado de suíno contra coelho – Dako[®]) na concentração de 1:200, com incubação durante 60 minutos, seguida de lavagem com solução tampão e aplicação de estreptavidina-peroxidase Kit Nel 700 na concentração de 1:100 por 60 minutos, e tríplice lavagem com solução de PBS 1X por 5 minutos.

Após os sítios da reação foram evidenciados pela tiramida-fluoresceína do “Kit Tyramide Signal Amplification” (TSA – Kit Nel 701 – Perkin Elmer[®]), aplicada sobre as células na concentração 1:50 durante 10 minutos, e posterior tríplice lavagem com solução de PBS 1X.

Os núcleos foram marcados com iodeto de propídeo (SIGMA, St Louis), marcador de ácido nucléico, aplicado sobre as células na concentração final de 10µl/ml em PBS, por um período de 30 minutos ao abrigo da luz.

A montagem das lâminas foi realizada com lamínula, sob a qual foi adicionado o meio de montagem preservador de fluorescência, PROBE[®] (Molecular PROBES INC, New York).

O registro das imagens foi realizado com auxílio do microscópio da marca Olympus BX 60, com câmera da Zeiss Axio Cam, utilizando-se o programa KS 400, do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-Histoquímica, do Departamento de Cirurgia FMVZ-USP, este microscópio possibilitou a captação da emissão de fluorescência verde do conjugado fluoresceína e tiramida, correspondente à conexina e da fluorescência vermelha do iodeto de propídeo, em conjunto e em separado, através da interposição de filtros simples e duplos.

Outros registros de imagens foram realizados com o Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LSM 510) da Zeiss, utilizando-se para leitura e visualização o Software (LSM Image Browser), disponível no site do Laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB/USP, disponível no site www.biocel.icb.usp.br do Laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP.

Registraram-se imagens que pudessem caracterizar a expressão e a distribuição da Cx32 e Cx43 no interior das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) bovinas e no interior das demais células gigantes trofoblásticas (CGT) encontradas. Além disso, as células gigantes trofoblásticas (CGT) foram analisadas quanto a sua conformação, de modo comparativo com as células colunares trofoblásticas (CCT) utilizando o sistema de imagem.

Estabeleceu-se quatro tipos de controles (Quadro 1):

- ❑ Primeiro experimento, após 24 horas de cultivo retiramos o sobrenadante de meio de cultura (D-MEM) da placa e adicionamos outros novos 3 ml de D-MEM, neste experimento não adicionamos hormônios (cultura pura).
- ❑ Segundo experimento, após 24 horas de cultivo retiramos o sobrenadante de meio de cultura (D-MEM) da placa e adicionamos outros novos 3 ml de D-MEM, este agora contendo 10 ng/ml de progesterona.
- ❑ Terceiro experimento, após 24 horas de cultivo retiramos o sobrenadante de meio de cultura (D-MEM) da placa e adicionamos outros novos 3 ml de D-MEM, este agora contendo 50 ng/ml de estrógeno.
- ❑ Quarto experimento, após 24 horas de cultivo retiramos o sobrenadante de meio de cultura (D-MEM) da placa e adicionamos outros novos 3 ml de D-MEM, este agora contendo 10 ng/ml de progesterona e 50 ng/ml de estrógeno.

Em todos os experimentos a cultura permaneceu em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ até o quinto dia.

Tabela 2 - Representação do controle realizado para os três grupos gestacionais

	Etapa da gestação		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Cultura pura	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43
Progesterona (10 ng/ml)	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43
Estrógeno (50 ng/ml)	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43
Progesterona/estrógeno (10 ng/ml e 50 ng/ml)	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43	Cx32 e Cx43
Total de dias de cultivo: 05 (cinco).			

4.7 APLICAÇÃO DE HORMÔNIOS EM CULTURA

Todos o hormônios foram diluídos com solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (solução fisiológica) em condições assépticas.

Composição: cada 100ml contém

Cloreto de sódio.....0,9g

Água para injeção q. s. p.....100 ml

4.7.1 Aplicação de progesterona

Para aplicação de progesterona utilizou-se uma ampola (1 ml) de hormônio Promone-E[®] em suspensão aquosa estéril (Acetato de medroxiprogesterona) frasco-ampola contendo (50mg/ml) de uso veterinário, Pharmacia Brasil Ltda.

Composição:

Acetato de medroxiprogesterona.....	50mg
Polietilenoglicol 4000.....	28,8mg
Polisorbato 80.....	1,92mg
Cloreto de sódio.....	8,65mg
Metilparabeno.....	1,73mg
Propilparabeno.....	0,19mg
Água destilada.q.s.p.....	1ml

Na diluição do produto utilizamos 0,08 µl de progesterona em 250 ml de soro fisiológico, sendo que do resultado desta diluição retirou-se 24 µl e adicionou-se aos 3 ml de meio de cultura. A dosagem hormonal foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica da FMVZ/USP.

4.7.2 Aplicação de estrógeno

Para aplicação de estrógeno foi utilizado o hormônio Benzoginoestril ap[®] (Hexaidrobenzoato de estradiol), solução injetável de ação prolongada caixa com duas ampolas com 1 ml cada produzido por: BOEHRINGER INGELHEIM S.A. O hexaidrobenzoato de estradiol possui intensa ação estrogênica, que se mantém durante cerca de três semanas após uma única injeção, reproduzindo, assim, o aspecto característico de curva estrogênica natural.

Cada ampola contém:

Hexaidrobenzoato de estradiol.....	5mg
Veículo q. s. p.....	1ml

Na diluição do produto utilizamos 0,25 µl de estrógeno em 250 ml de soro fisiológico, sendo que do resultado desta diluição retirou-se 24 µl e adicionou-se aos 3 ml de meio de cultura. A dosagem hormonal foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica da FMVZ/USP.

4.7.3 Aplicação de progesterona conjugado ao estrógeno

Para aplicação de progesterona conjugado com estrógeno foi utilizado Gestadiona[®] (Valerato de estradiol/caproato de hidroxiprogesterona), um único cartucho conjugado contendo 1 ampola com 1 ml, produzido por: BOEHRINGER INGELHEIM S.A.

Cada ampola contém:

Valerato de estradiol.....	5mg
Caproato de hidroxiprogesterona.....	1ml

Na diluição do produto utilizamos 0,24 µl do conjugado de progesterona e estrógeno em 500 ml de soro fisiológico, sendo que do resultado desta diluição retirou-se 24 µl e adicionou-se aos 3 ml de meio de cultura. A dosagem hormonal foi desenvolvida no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica da FMVZ/USP.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CULTIVO

De todas as técnicas a que melhor resultados obtivemos em relação à fixação celular foi a placa de polietileno (estéril) sem gel de 60 mm de diâmetro, contendo suspensão celular e acondicionada em incubadora à temperatura de 37°C e atmosfera gasosa de 5% de Co₂ em D-MEM com 10% de SFB. O tempo de incubação pelo período de 24 horas para as reações imunofluorescentes do anticorpo primário mostrou-se o mais adequado, este tempo é necessário para que ocorra uma forte ligação entre antígeno e anticorpo.

5.2 CONSTITUIÇÃO DOS TIPOS CELULARES NOS TRÊS GRUPOS GESTACIONAIS

Nas placas do grupo I foi encontrada a maior diversidade de tipos celulares. Constatamos também que as células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) estão presentes em quantidade moderada, permeando as demais células trofoblásticas. Nesta fase da gestação os dois núcleos da célula gigante trofoblástica binucleada são simétricos e levemente ovalados ocupando em conjunto, metade a dois terços do espaço citoplasmático das CGTB. As CGTB apresentam também heterocromatina difusa distribuída no interior do núcleo, e um pouco menos difusa quando comparada com as células colunares trofoblásticas (CCT) e células gigantes trofoblásticas multinucleadas (CGTM). Porém, observamos em algumas CGTB a presença de pequenos grumos de heterocromatina condensada no interior do núcleo (Figura 3). Nesta fase notamos também a presença de células gigantes trofoblásticas multinucleadas (CGTM), com distribuição semelhante à descrita para as CGTB (Figura 4). As CGTM apresentam pouca área citoplasmática, núcleo de forma globosa, muitas vezes o tamanho do núcleo representa as mesmas dimensões do volume nuclear das CGTB. As células colunares trofoblásticas (CCT), que possuem um volume citoplasmático menor, estão presentes em grande quantidade nesta fase.

No grupo II é observado um grande número de CGTM com formato mais arredondado do núcleo, heterocromatina frouxa e maior quantidade de citoplasma quando comparado as CGTB, afastando os limites celulares do núcleo. Nesta fase um grande número de CGTM constituídas por um único núcleo grande e heterocromatina com vesículas bem definidas (Figura 5).

Nesta fase algumas vezes é necessário diferenciar as CGTM das CGTB que apresentam um segundo núcleo pequeno. Essa diferenciação é possível através de variações na captação das fluorescências de forma a identificar apenas as áreas de heterocromatina marcadas pelo iodeto de propídeo marcado em vermelho, evidenciando a presença do segundo núcleo, mesmo em situações de sobreposição com o núcleo maior.

As células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) e células gigantes trofoblásticas multinucleadas (CGTM) possuem um volume nuclear que em alguns casos possuem as mesmas dimensões das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB).

O grupo III apresenta-se mais homogêneo quanto aos tipos celulares encontrados, este aumento se deve à quantidade de CGTB, quando comparado ao número de CGTM e CCT em relação aos grupos I e II. A grande maioria das células que compõe a placa é formada por células colunares trofoblásticas, algumas células gigantes trofoblásticas binucleadas e poucas células gigantes trofoblásticas trinucleadas e multinucleadas. Neste grupo as CGTB apresentam formas globosas, seu tamanho varia conforme o terço gestacional, mas sendo de três a quatro vezes maiores que o tamanho das CCT, apresentando ainda núcleos com formatos irregulares e maior adensamento de heterocromatina.

5.3 EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 32 E 43 SEM ADIÇÃO DE HORMÔNIOS

5.3.1 Conexina 32

No grupo I (cultura pura) não foi observada a expressão da Cx32 ao microscópio confocal, apenas os núcleos marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo (Figura 4).

No grupo II a CGTB possui um formato ovalado. Ao se observar os dois núcleos, nota-se que ambos se comprimem, apresentando com isso formas variadas, podendo o tamanho dos núcleos nesta fase chegar de duas a três vezes maior que o tamanho do núcleo das CCT (Figura 5). A heterocromatina de ambos os núcleos da CGTB é frouxa, dispersa no núcleo, mas com maior número de grumos (Figura 6). Observamos também que o citoplasma da CGTB neste período é abundante aumentando o distanciamento dos limites celulares em relação aos núcleos, formando em algumas células um conjunto de núcleos que ocupa quase um terço ou metade do volume citoplasmático. A Cx32 nesta fase é vista de forma mais expressiva talvez pelo fato que a conexina esteja mais amplamente distribuída na região citoplasmática da célula e um pouco sobre o núcleo celular.

A expressão da Cx32 no grupo III apresenta-se menos intensa quando comparamos com o grupo II. A expressão da Cx32 nesta fase gestacional não é vista em todas as células CGTM e CCT presentes na placa de cultivo, porém quando aparecem sua expressão é mais nítida e geralmente localizada em algumas das estruturas da célula como na região do citoplasma (Figura 7).

Nesta fase observamos também, que a Cx32 apresenta marcação bem definida, localizada na região do núcleo, ficando a Cx32 mais evidente. Observa-se que as CCT próximas a CGTB também expressam Cx32. Nas células gigantes trofoblásticas binucleadas observamos uma sinalização da Cx32 com as CCT próximas, podendo ser o início da formação da CGTT. Observa-se que as CCT próximas a CGTB também expressam Cx32 (Figura 7).

5.3.2 Conexina 43

No grupo I a conexina 43 é encontrada no citoplasma das CGTB, CGTM e CCT (Figura 8). As CCT no grupo I apresentam vesículas de heterocromatina bem definidas, a Cx43 é disposta em algumas CCT da cultura na região do citoplasma e sobre o núcleo onde muitas vezes encobre-o dificultando sua visualização.

Nesta fase a Cx43 esta localizada no citoplasma da CGTB com baixa expressão, em algumas destas células a conexina localizada no citoplasma onde possui marcação voltada para o núcleo de células CCT próximas a ela (Figura 9A).

As CGTM apresentam nesta fase da cultura uma forte marcação da Cx43 sobre o núcleo e região citoplasmática, e quando próximas às CCT a expressão da conexina intensifica-se no pólo citoplasmático voltado à célula vizinha. Grande número de CGTM é observado nesta fase (Figura 9 B).

O grupo II revela que a Cx43 é encontrada na maioria das células da cultura principalmente nas CCT que apresentam variações na quantidade e distribuição da conexina. Nesta fase a Cx43 permanece na maioria das vezes na região citoplasmática, sem formar as junções comunicantes (Figura 10).

Observamos ao microscópio confocal que a Cx43 também é expressa em CGTB, na forma de finos grânulos localizados lateralmente aos núcleos celulares, no entanto sem se sobrepor a eles, isso fica bem evidente quando observamos o núcleo da CGTB marcado por iodeto de propídeo. Outra observação feita foi que a heterocromatina já começa a ficar evidente no núcleo celular (Figura 11A). As CCT observadas apresentam a Cx43 localizada sobre o núcleo como se fosse uma nuvem, a heterocromatina é evidente também neste grupo celular. As CGTM apresentam marcação forte e bem evidente da Cx43, onde observamos expressões lateralmente ao núcleo destas células com outras CCT (Figura 11B).

No grupo III quando observamos as CGTB notamos que a conexina está localizada sobre os núcleos ou entre os dois núcleos da célula, a heterocromatina neste período fica bem evidente

(Figura 12). As CGTM apresentam marcação intensa para a Cx43, nesta fase as conexinas localizam-se sobre o núcleo das células, a heterocromatina também se intensifica como acontece em todas as células da cultura. Notamos também que em algumas CCT, quando próximas umas das outras, ocorre uma intensificação da expressão em um dos lados do núcleo, geralmente o lado voltado ao núcleo da célula vizinha. Também observamos grande quantidade de CGT expressando a Cx43, nesta fase a quantidade de CGTT aumenta na cultura celular (Figura 13).

Na microscopia de fluorescência comum, observamos que em algumas células a marcação da Cx43 estava localizada no interior do núcleo. Para confirmar a localização intranuclear da Cx43, levamos as lâminas ao microscópio confocal, onde fizemos uma série de imagem no plano Z, as quais foram remontadas e analisadas tridimensionalmente pelo programa de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM 510) da Zeiss, utilizando-se para leitura e visualização destes arquivos o Software (LSM Image Browser). Após várias reconstruções no plano Z, foi possível constatar a colocalização da Cx43 e o núcleo. Na reconstrução da série Z de imagens, a Cx43 é observada no interior do núcleo, entre os grumos de heterocromatina corados em vermelho pelo iodeto de propídio (Figura 14).

As placas juncionais nesta fase não são observadas entre as CGT, mas a grande intensidade na marcação das proteínas no interior de algumas células dificulta distinção dos limites celulares.

5.4 EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 32 E 43 COM ADIÇÃO DE HORMÔNIOS

5.4.1 Conexina 32 (progesterona)

No grupo I observamos que as células trofoblásticas passaram a expressar Cx32 no citoplasma em pequena quantidade. No grupo II observamos que a intensidade de coloração da conexina aumenta, mas permanece ainda na mesma região citoplasmática da célula. No grupo III a conexina aumenta sua expressão, sendo que em algumas áreas é difícil definir os limites celulares, nestes locais a marcação da fluorescência fica mais intensa (Figura 15).

5.4.2 Conexina 32 (estrógeno)

No grupo I observamos que a expressão da Cx32, é vista em algumas células muito fracamente, porem em outras a marcação se intensifica, mas a expressão está voltada lateralmente ao núcleo celular, o mesmo acontece para o grupo II. No grupo III para o cultivo celular na qual adicionamos estrógeno às culturas, observamos que a expressão da Cx32 intensifica e está visível ao redor das células da cultura e sobre alguns núcleos (Figura 16).

5.4.3 Conexina 32 (progesterona/ estrógeno)

Com o auxilio do microscópio de fluorescência podemos evidenciar que na cultura celular onde adicionamos progesterona/estrógeno inicia-se a expressão da conexina 32 no grupo I, porém em menor quantidade que quando só é adicionado a progesterona. No grupo II se destaca de maneira intensa, nesta fase as conexinas estão presentes sobre o núcleo da célula em grande quantidade obscurecendo visualização dos núcleos celulares. No grupo III a expressão da Cx32 é vista na região sobre o núcleo da célula, encobrendo praticamente todo o conjunto de células (Figura 17).

5.4.4 Conexina 43 (progesterona)

No grupo I observamos que a expressão da Cx43, é reduzida em algumas células em comparação ao grupo II e III. No grupo II a Cx43 é vista nas áreas ao redor do núcleo sem sobrepô-lo. No grupo III para o cultivo celular na qual adicionamos progesterona observamos que a expressão da Cx43 se intensifica. A heterocromatina apresenta-se intensa em forma de grumos por sobre os núcleos da célula (Figura 18).

5.4.5 Conexina 43 (estrógeno)

No grupo I podemos observar com ajuda do microscópio expressão média quando comparada com os outros dois grupos (II e III). No grupo II a expressão da Cx43 foi a mais baixa em relação aos grupos I e III. No grupo III onde adicionamos estrógeno observamos a maior expressão da Cx43 em células da cultura (Figura 19).

5.4.6 Conexina 43 (progesterona/ estrógeno)

No grupo I a Cx43 é expressa entre as células da cultura placentária, deixando os núcleos celulares visíveis. No grupo II a Cx43 mostra as células da cultura com a conexina próxima ao núcleo celular, as células nesta fase apresentam formação de heterocromatina. No grupo III para o cultivo celular na qual adicionamos progesterona/ estrógeno, a Cx43 intensifica sua expressão sinalizando lateralmente aos núcleos das células. A heterocromatina apresenta-se intensa em forma de grumos por sobre os núcleos da célula (Figura 20).

Figura 3 - Fotomicrografia de célula gigante trofoblástica binucleada do terceiro terço gestacional da placenta bovina em cultura. A imagem apresenta uma CGTB bovina, com os dois núcleos corados pelo iodeto de propídeo expressando vesículas de heterocromatina globosas. Ao redor dos núcleos, em verde, na região do citoplasma observa-se expressão da Cx43. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 25 μ m)

Figura 4 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase gestacional obtida com auxílio de microscópio confocal. A imagem realizada com filtro verde mostra a marcação do núcleo da CGTB pelo iodeto de propídeo em vermelho. A imagem mostra que não ocorreu marcação para a Cx32. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 5 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. Verificamos células gigantes trofoblásticas binucleadas (seta simples) e células gigantes trofoblásticas mononucleadas (seta dupla) marcadas pela presença da Cx32 em verde intenso. A imagem mostra com exatidão a delimitação dos núcleos marcados pelo iodeto de propídeo em vermelho, com a marcação da Cx32 em algumas células e está pouco expressiva na CGTB, já para a CGTM a Cx32 aparece lateralmente ao núcleo da célula. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 6 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem mostra com exatidão a delimitação do núcleo da CGTM (seta simples) marcada pelo iodeto de propídeo em vermelho, com a Cx32 localizada no citoplasma. A seta dupla mostra a marcação da Cx32 na CGTB no citoplasma. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 7 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em terceira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem mostra a expressão da Cx32 na CGTB (seta simples) e na CGTM (seta dupla) ambas com o núcleo corado em vermelho pelo iodeto de propídeo. Na CGTB (seta simples) a Cx32 está disposta lateralmente ao núcleo da célula, na CGTM (seta dupla) a Cx32 expressa também marcação voltada lateralmente para um dos pólos da célula. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 8 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem observada com filtro simples mostra com exatidão a delimitação dos núcleos marcados pelo iodeto de propídeo em vermelho para ambos os tipos celulares. A imagem mostra uma forte marcação para a Cx43 na grande maioria das células em cultura. A imagem (cabeça da seta) mostra as CCT com núcleo menor; as células identificadas pela (estrela) mostram a CGTM; seta simples mostra a CCT expressando a Cx43 voltada para células que estão próximas a elas; a seta dupla mostra a CCT expressando a Cx43 voltada para uma CGTB com a Cx43 na região do citoplasma. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 9. Fotomicrografias da cultura de células trofoblásticas bovina em primeira fase da gestação obtidas com auxílio de microscópio confocal. A imagem (A) mostra a CGTB (seta) expressando a Cx43 em verde intenso em forma de pontuações e também mantendo sinalização com uma célula colunar trofoblástica. A imagem (B) mostra a CGTM (seta dupla) com heterocromatina intensa e Cx43 sendo expressa no citoplasma e sobre o núcleo da célula; a CCT (seta simples) mostra a expressão da Cx43 voltada para o lado da CGTM. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μm)

Figura 10 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em segunda fase da gestação. A imagem mostra a CGTB (dupla) expressando a Cx43, em fina granulação verde em áreas mais distantes dos núcleos e com uma pequena expressão sobre o núcleo duplo e a CCT (seta simples) com vários pontos de adensamento de heterocromatina apresenta marcação mais intensa da Cx43 no interior do núcleo, demonstrando pouco a marcação do núcleo pelo iodeto de propídeo. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 11 - Fotomicrografias de cultura de células da placenta bovina do segundo terço gestacional. A imagem (A) realizada com filtro duplo, mostra a expressão da Cx43 no interior da CGTM (seta simples), já a marcação para a CGTB (seta dupla) mostra que a Cx43 está presente na área do citoplasma. A imagem (B) realizada com filtro duplo, mostra a Cx43 (seta simples) distribuída no citoplasma da célula CCT, a seta dupla mostra a CGTM próxima a uma CCT com forte expressão de Cx43, a CGTM está em contato com uma CCT. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 12 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina em terceira fase da gestação. A imagem mostra a CGTB (seta simples) onde a Cx43 está localizada encobrindo o núcleo das células o mesmo acontece para as CGTM (seta dupla) com vários pontos de adensamento de heterocromatina. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 20 μ m)

Figura 13 - Fotomicrografia da cultura de células trofoblásticas bovina da terceira fase gestacional. A imagem mostra a Cx43 sobre o núcleo da célula, nota-se que nas áreas onde a heterocromatina apresenta suas vesículas a conexina apresenta-se mais esparsa. O núcleo da CGTT marcada pelo iodeto de propídeo em vermelho evidenciando grandes vesículas de heterocromatina, a Cx43 é vista com finos grânulos dispostos ao redor dos três núcleos marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μm)

Figura 14 - Fotomicrografias da cultura de células trofoblásticas bovina da terceira fase gestacional. A imagem (A e B) mostra que quando a série de imagens é empilhada e observada em corte transversal, pode-se notar que a Cx43 está colocalizada com a cromatina no interior do núcleo. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 10 μ m)

Figura 15 - Fotomicrografias de cultura de células placentária bovina com adição de progesterona. A imagem (A) primeiro terço gestacional; (B) segundo terço gestacional; (C) terceiro terço gestacional. Temos em verde a expressão da Cx32 lateralmente as CGT, contrastando com o vermelho dos núcleos marcados. Na imagem (A) a Cx 32 começa a ser expressada após a adição de progesterona. Na imagem (B) a Cx32 inicia a expressão. A imagem (C) mostra um aglomerado de células trofoblástica expressando a Cx32 em verde, e vários núcleos agrupados e marcados, em vermelho, pelo iodeto de propídeo, neste grupo celular podemos evidenciar uma grande expressão para a Cx32. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

Figura 16 - Fotomicrografias de cultura de células placentária bovina com adição de estrógeno. A imagem (A) primeiro terço gestacional; (B) segundo terço gestacional; (C) terceiro terço gestacional. Temos em verde a expressão da Cx32 lateralmente as CGT, contrastando com o vermelho dos núcleos marcados. A imagem (A) mostra aglomerado de CGT expressando a Cx32 em verde lateralmente aos núcleos celulares. Na imagem (B) temos as CGT com expressão da Cx32 nas áreas mais distantes do núcleo. A imagem (C) apresenta maior expressão da Cx32 em muitas CGT, quando comparamos com as demais imagens. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

Figura 17 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona/ estrógeno. A imagem (A) mostra no primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT com uma marcação pouco expressiva para Cx32. Na imagem (B) segundo terço gestacional tem as CGT com expressão da Cx32 encobrindo algumas células e em outras ficando evidente o núcleo marcado pelo iodeto de propídeo. A imagem (C) mostra no terceiro terço gestacional uma maior expressão da Cx32 em muitas CGT, em forma de nuvem encobrindo praticamente os núcleos da CGT marcados com iodeto de propídeo impedindo a visualização da heterocromatina. Dupla coloração para a conexina 32 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

Figura 18 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona. A imagem (A) mostra o primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT com pouca marcação nas células para Cx43. Na imagem (B) segundo terço gestacional mostra as CGT com expressão da Cx43 ao redor dos núcleos ficando evidente o núcleo marcado pelo iodeto de propídeo. A imagem (C) mostra o terceiro terço gestacional uma maior expressão da Cx43 em muitas CGT, forma uma marcação ao redor dos núcleos. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

Figura 19 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas em primeiro terço gestacional com adição de estrógeno e expressão da Cx 43. A imagem (A) mostra um aglomerado de células trofoblástica expressando a Cx43 em verde, e vários núcleos agrupados e marcados, em vermelho, pelo iodeto de propídeo. A imagem (B) mostra a Cx43 dispersa entre as células trofoblásticas. A imagem (C) mostra uma nuvem de conexina ofuscando a imagem dos núcleos celulares. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

Figura 20 - Fotomicrografias de cultura de células bovinas onde se adicionou progesterona/ estrógeno para analisar a expressão da Cx43. A imagem (A) mostra no primeiro terço gestacional um aglomerado de CGT apresentando a conexina entre células da cultura placentária, deixando os núcleos celulares visíveis. Na imagem (B) segundo terço gestacional mostra as células da cultura com a conexina próxima ao núcleo celular, as células nesta fase apresentam formação de heterocromatina. A imagem (C) mostra o terceiro terço gestacional. Dupla coloração para a conexina 43 (FITC) e núcleo (iodeto de propídeo). (barra = 30 μ m)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra a presença das conexinas 32 e 43 no interior das células gigantes trofoblásticas da placenta bovina em meio de cultura, mas os aspectos mais importantes foram observados nas células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) e em células gigantes trofoblásticas multinucleadas (CGTM). As conexinas 32 e 43 expressadas nas CGTB apresentaram quantidade e distribuição variável de acordo com cada período gestacional estudado, sendo encontradas na região citoplasmática e no núcleo de algumas CGT sem formar junções comunicantes.

A proposta de realizar cultivo de células trofoblástica apóia-se na afirmação de Ralph et al. (1989), na qual a manutenção de uma camada de células trofoblástica em cultura retém as mesmas características do epitélio *in vivo* possibilitando o estudo de muitas funções celulares do trofoblasto. A vantagem do cultivo de células *in vitro* é estar livre das variações sistêmicas do organismo, bem como de interferências sobre a homeostase, ou das condições de estresse ao qual está exposto um organismo vivo em qualquer modelo ou situação experimental. A partir do cultivo de células é possível estudar a atividade molecular, fluxo intracelular, interação de produtos e secreções celulares (FRESHNEY, 1994).

As conexinas 32 e 43 foram escolhidas em função de relatos envolvendo estas proteínas em processos placentários, nos quais estão associadas à coordenação da contratilidade endometrial e desencadeamento do parto (BRUZZONE et al., 1996; HOUGHTON et al., 2002). Outro fator foi a expressão das conexinas no tecido epitelial materno, do qual as células gigantes trofoblásticas são procedentes (LEE et al., 1986), e relatos de trabalhos em placenta humana, na qual a ação destas proteínas propicia diferenciação celular resultando na formação de células trofoblásticas gigantes (CRONIER et al., 1996).

6.1 CULTURA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

Dificuldades na manutenção do cultivo celular por alguns dias e fixação ao substrato foram relatadas por vários autores. Isso também foi vivenciado por nós no início do experimento onde encontramos problemas no estabelecimento da cultura celular. O cultivo em placas contendo gelatina apesar dos bons resultados de fixação celular interfere na captação das imagens em imunofluorescência, assim com base em nossos resultados não recomendamos o cultivo celular com substrato de gelatina com o objetivo de capturar imagens para análise da expressão de conexinas. No segundo teste o maior entrave foi a não aderência destas células sobre o vidro até os processos finais da imuno-histoquímica. Assim o que nos levou a optar por um terceiro protocolo foi a constatação de que as células não aderiram bem ao vidro por apresentar superfície lisa. Na hipótese de que estas células aderem melhor a superfície porosa e irregular das placas de polietileno FALCON[®], testamos então o cultivo em placas de polietileno sem gelatina permitindo que um grande número de células trofoblásticas permanecesse aderida ao fundo, possibilitando boa visualização na expressão das conexinas.

Nosso cultivo celular demonstrou melhor viabilidade até quinto dia, neste período as células placentárias demonstraram boas condições de aderência e maior interação celular, o mesmo foi encontrado em cultivo de células trofoblásticas descrito por (BOSCH, 2006). Vários pesquisadores isolaram células binucleadas bovinas (MYERS; REIMERS, 1988), ovinas e canina (WOODING et al., 1996; WANGO et al., 1999), porém havia pouco sucesso com a cultura destas células por longo período de cultivo. Wooding; Flint (1994), descreveram que pequenas porções de células binucleadas puderam aderir ao frasco da cultura e foram resultado de rápida deteriorização e lise celular em até quatro dias. Outros autores encontraram dificuldades na permanência de CGT em cultura por mais de 24 horas (REIMERS et al., 1985; GROSS; WILLIAMS, 1988; MATAMOROS et al., 1994). Quando células gigantes trofoblásticas binucleadas eram encontradas isoladas preferiam aderir ao substrato colágeno, permanecendo vivas durante uma semana em cultura, embora perdendo um marcador fenotípico como produção de lactogênio placentário em quatro dias (NAKANO et al., 2001). A perda fácil de marcadores fenotípicos em células de cultura pode ser característica de células binucleadas, como também

visto em células binucleadas *in vivo*, onde sofrem atrofia e morrem uma vez que se fundem com células epiteliais uterinas e descarregam seu produto na circulação materna (WOODING; WANTHES, 1980; WOODING, 1982). Com passar dos anos e desenvolvimento de novas tecnologias, pesquisadores conseguiram estabelecer um protocolo efetivo para cultivo de CGT bovina pelo período de 90 dias. Durante este período as CGTB eram isoladas das demais CGT onde permaneciam vivas até mesmo na presença do substrato colágeno (LANDIM JR. et al., 2007). Este achado pode ser explicado pelo fato da cultura utilizada ser composta de 90% de CGT e 10% de fibroblastos. Talbot et al., (2000) haviam utilizado anteriormente esta mesma linha de raciocínio para o cultivo de células fibroblásticas, com uso de células derivadas do blastocisto bovino. A camada de colágeno na placa age pelo menos de duas maneiras: oferece uma matriz fisiológica para anexo de células de epiteliais polarizadas (PUCK et al., 1997) e armazena uma variedade de fatores de crescimento (REXROAD; POWELL, 1997) que são essenciais para sobrevivência de células epiteliais (MERTO et al., 1997). Para nosso objetivo, a utilização do colágeno poderia produzir as mesmas dificuldades de observação que encontramos com a gelatina, razão pela qual resolvemos não utilizar este meio. Contudo esta hipótese ainda necessita ser testada.

Constatamos que as conexinas não resistem a longos períodos de fixação por paraformaldeído 4%, por este motivo logo após a montagem da lâmina tem-se a necessidade de coleta dos dados com auxílio do microscópio de fluorescência ou confocal, isso levou-nos a testar alguns protocolos de reações imuno-histoquímicas para intensificar e prolongar a fluorescência das conexinas. Dentre os três tempos de incubação testados para reações imuno-histoquímicas do anticorpo primário o melhor resultado foi o período de 24 horas em câmara úmida a 4°C, esse tempo permitiu uma ligação estável entre antígeno e anticorpo. Em nosso trabalho, assim como descrito por Carvalho (2004), a técnica de imuno-histoquímica escolhida para a localização das conexinas e marcação dos núcleos celulares pelo iodeto de propídeo em muito contribuíram para análise das CGT. A transparência das estruturas, associada à emissão de fluorescência observada ao microscópio possibilitou avaliação até mesmo de camadas sobrepostas. As melhores imagens foram obtidas com auxílio do microscópio confocal no qual foram feitos estudos em 30 cortes ópticos por placa. Com a utilização de uma ferramenta do programa do Microscópio Confocal de

Varredura Laser (LSM 510) da Zeiss, Alemanha, a sobreposição destas camadas em movimento, permite-nos a formação de imagem tridimensional da estrutura celular.

6.2 GRUPO I CULTURA PURA

A ocorrência e distribuição das CGT, nas três fases gestacionais analisadas neste trabalho, seguiram os mesmos padrões encontrados por Morais-Pinto (2002), havendo aumento progressivo da população de CGTB no grupo I (primeiro terço gestacional) e II (segundo terço gestacional) e redução no grupo III (terceiro terço gestacional). Nos grupos celulares não foram realizadas quantificações, mas conforme o esperado no grupo I encontramos menor quantidade de CGTB e maior quantidade de CGTM, o mesmo foi evidenciado por King et al., (1982); Carvalho (2004) em cortes no tecido placentário evidenciaram células jovens distribuídas nos tecidos cotilédones com formação de vilos coriônicos maternos (LEE et al., 1986). Nesta fase encontramos CGTB jovens, globosas e relativamente pequenas, evoluindo para células gigantes com citoplasma abundante e núcleo com heterocromatina frouxa, o mesmo foi relatado por vários pesquisadores (KLISCH et al., 1999a, 1999b; CARVALHO et al., 2000; MORAIS-PINTO, 2002).

A frequência das CGTB e CGTT encontradas nos três grupos, explica o envolvimento dessas células na modificação do epitélio uterino desde a implantação do embrião até o término da gestação. Além disso, observamos maior frequência dessas células no grupo I e II, sugerindo ser esta uma fase de grande atividade celular na qual ocorre maior interação feto-maternal. Morgan et al., (1989) constataram que a produção sequencial de proteínas indica que as células trofoblásticas bovina possuem diferentes funções de acordo com o estágio da gestação e importante papel durante a implantação do embrião e desenvolvimento de vilos. Esse aumento da atividade celular é justificado pelos relatos de Klisch et al., (2005) ao demonstrarem que as glicoproteínas associadas à gestação são secretadas pelas CGTB no grupo II.

6.3 GRUPO II CULTURA PURA

Neste período ocorre maior variação dos tipos celulares, as células encontram-se em intensa atividade funcional caracterizando ser esta fase de grande importância para nutrição do feto, pois se observa no núcleo da célula grande formação de heterocromatina, confirmando as observações de Klish et al., (2005).

6.4 GRUPO III CULTURA PURA

No grupo III, período que antecede ao parto, observamos diminuição no número de CGTB, nesta fase as CGTB estão migrando ou já migraram para o lado materno da placenta. Este grupo apresenta-se homogêneo quanto à diversidade de tipos celulares presentes, pela fusão das CGTBs com as CGT maternas, aumentando o número de CGTT. Neste grupo III as CGTB possuem forma globosa e maior concentração de heterocromatina em relação ao grupo I e II. A quantidade de CGTT no grupo III é maior com a proximidade do parto devido a fusão das CGTB com CCT. As CGTM apresentaram frequências diferentes aumentando de acordo com a evolução da gestação, demonstrando sua importância na homeostase da placenta até o momento do parto. Identificamos CGTT formadas por um processo de mitose acitocinética tripolar em que os núcleos se apresentam simétricos em razão do arranjo dos cromossomos na metáfase em forma de Y, conforme reportado por Klish et al., (1999a). Este arranjo foi visto em nossa cultura onde a CGTT possui a formação de Y com os três núcleos iguais e dispostos simetricamente, sendo inclusive em uma destas células onde evidenciamos que a conexina encontra-se dentro do núcleo da célula e não apenas por sobre o núcleo com muitos autores assim relatam.

6.5 EXPRESSÃO DA CONEXINA 32 EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

No grupo I não evidenciamos expressão da Cx32 em nenhum dos tipos celulares presentes na cultura, a única imagem registrada da placa de cultivo foi a marcação em vermelho do núcleo das células pelo iodeto de propídeo. O mesmo foi observado por Pfarrer et al., (2004) em corte histológico de placentônio. No placentônio bovino do grupo I a Cx32 está localizada no epitélio endometrial exclusivamente em septos maternos, os quais são descritos como zonas de crescimento (PFARRER et al., 2003). As CGT migram no placentônio bovino pela influência da Cx26 e Cx43, desde que as CGT expressem RNAm. Embora para a Cx32 o RNAm esteja presente na CGT, a proteína não é detectada sugerindo a não tradução da Cx32 no grupo I (PFARRER et al., 2004). Segundo Pfarrer et al., (2004) o placentônio bovino é o lugar mais propenso a ser invadido pelo cório onde os cotilédones fetais começam a interagir com a carúncula uterina. A Cx32 é especificamente expressada no epitélio uterino materno, sendo então a Cx32 uma candidata provável ao controle de invasão ou determinação da quantidade de células que invadem o vilo primário. O incentivo para expressão da Cx32 pode ser o crescimento do trofoblasto (WINTERHAGER et al., 1988; ANTOSKIEWICZ, et al., 1996) hormônios esteróides e/ou receptores (ORSINO et al., 1996). A observação da ausência da expressão das conexinas no início do período gestacional está de acordo com os autores citados. Porém a expressão da Cx32 é vista a partir do desenvolvimento das membranas fetais, ou com adição de hormônios que estimulem os receptores destas células a expressar a Cx32 isso foi demonstrado em nosso experimento.

6.6 EXPRESSÃO DA CONEXINA 43 EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

No grupo I encontramos grande diversidade celular com presença de CCT, CGTM, CGTB, e CGTT, indicando fase de grande atividade celular e de interação feto-maternal e migração das CGT para o tecido materno. Esta diferenciação celular ocorre na formação da camada embrionária ectodermal (LEE et al., 1986). Cronier et al. (1996), destacam ainda que em

placentas humanas a ação da Cx43 favoreceu a diferenciação celular com formação de CGT. Neste grupo I encontramos expressão da Cx43 justaposta aos núcleos das CGT em forma de fino rendilhado sobre a membrana citoplasmática. Resultados semelhantes foram descritos em estudos para esta proteína indicando que a mesma encontra-se em estágio de pré-fosforilação dentro do retículo endoplasmático rugoso (PURANAN et al., 1993). Esta localização também foi descrita em estudos sobre fosforilação e transporte da Cx43 (MUSIL; GOODENOUGH, 1991; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2001).

Encontramos no grupo I expressão da Cx43 em CGTB no citoplasma da célula voltado para outras CGT da cultura, podendo indicar algum tipo de comunicação não juncional entre as células não demonstradas em CGTB *in vivo* (DUELLO et al., 1986; WOODING; BECKERS, 1987; ZOLI et al., 1992). A Cx43 foi localizada no estroma das criptas maternas e em menor quantidade no mesênquima fetal de todos os grupos (PFARRER et al., 2006). No tecido, as CGT ao redor do vilo apresentaram marcação, sendo que as CGT do grupo I e III exibiam expressão na membrana citoplasmática, nas CGTT a expressão da Cx43 foi observada voltada para a região dos vasos sanguíneos maternos e no mesênquima fetal (PFARRER et al., 2006). A Cx43 ocorre no tecido conjuntivo da carúncula e mesênquima fetal (CARVALHO, 2004), assim a arquitetura, o crescimento do septo materno e vilo fetal, podem ter sido influenciados pela presença da Cx43 nas junções comunicantes que compõem o estroma do placentônio (HUNTER et al., 2003).

No grupo III observamos na CGTT com auxílio do microscópio confocal forte expressão da Cx43 no interior do núcleo com ajuda de uma ferramenta do programa LSM que dispõem de duas linhas (X e Y) quando movidas sobre a célula mostram imagens obtidas por secções transversais que permitem visualizarmos a Cx43 no interior do núcleo sugerindo seu relacionamento no controle da expressão gênica. Existem evidências que as conexinas, além de seu papel na comunicação celular, também atuam como promotores da expressão de outras moléculas também implicadas no processo da comunicação celular, como as E-caderinas (Yano et al., 2001). Assim, sua presença no núcleo celular pode indicar um papel direto desta molécula nos mecanismos de ativação de genes, embora como seja atuação ainda esteja por ser esclarecido. Outra observação é a intensa quantidade de grânulos de heterocromatina ao final da gestação. A E-caderina e B-catenina acumulam-se no citoplasma das CGTB. A E-caderina é uma glicoproteína

transmembrana normalmente expressada em vesículas no limite intercelular das células epiteliais inclusive no trofoectoderma bovino (OHTA et al., 1994; HUNYADY et al., 1996; NAKANO et al., 2005). As vesículas que contêm E-caderina migram para frente das células binucleadas estabelecendo contato com o ápice das células epiteliais uterinas. As células perdem E-caderina durante a diferenciação celular (BEYER et al., 1987; MUSIL; GOODENOUGH, 1991; RIVEDAL et al., 1994). A invasão das células trofoblásticas gigantes estende-se à decídua enquanto as células binucleadas limitam-se à região epitelial da carúncula uterina (MEHTA et al., 1986). Assim, diferenças em resposta à E-caderina refletem no grau de atividade migratória do trofoblasto invasivo na espécie. Resultados de imunofluorescência indicam que além da E-caderina a B-catenina foi acumulada no citoplasma das células binucleadas, ambas *in vivo* e *in vitro*. Porém o padrão de marcação de B-catenina era expressa no núcleo da CGTB sugerindo que a proteína, a qual possui papel de adesão celular possa funcionar como sinalizador molecular. A E-caderina é cálcio dependente e faz adesão celular em seu domínio extracelular, enquanto seus domínios citoplasmáticos interagem com a actina no transporte e entrega da E-caderina e Cx43 para a superfície da célula (HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2001). A Cx43 está associada a outro componente da junção ocludens (GIEPMANS; MOOLENAAR, 1998; TOYOFUKU et al., 1998) já a Cx32 interage com outros componentes da junção ocludens (KOJIMA et al; 1999). O acúmulo de E-caderina no citoplasma é pertinente a funções de células binucleadas maduras incluindo a migração celular (NAKANO et al., 2005). O microscópio eletrônico revelou que muitas vesículas claras e pequenas estão presentes no citoplasma e migram de CGTB parecendo estarem inseridas no topo das junções ocludens (PAGANO; MARTIN, 1998). Esta contínua inserção de novas formas de membrana permite expansão e migração com íntima justaposição da célula no lado materno (PAGANO; MARTIN, 1998). Observações ao microscópio de fluorescência indicam que além da E-caderina a B-catenina foi acumulada no citoplasma da CGTB *in vivo* e *in vitro* (NAKANO et al., 2005). A B-catenina foi encontrada no citoplasma da célula e, além disso, expressa nos núcleos da CGTB (NAKANO et al., 2005). No citoplasma o acúmulo da B-catenina sugere que a proteína tem função de adesão como uma molécula de sinalização intracelular caracterizando melhor secreção de proteínas que atuam como mediadores locais para controlar o desenvolvimento celular (MUSIL; GOODENOUGH, 1991). Ativação da WNT estabiliza a B-catenina no citoplasma pela inibição da degradação proteolítica de B-catenina. Tanto o citoplasma quanto o núcleo acumulam B-catenina em células binucleadas

imaturas, implicando a B-catenina no papel de maturação de células binucleadas, isso está positivamente correlacionado com o conteúdo do DNA da CGTB (NAKANO et al., 2005). O WNT é responsável pelos genes incluindo os que promovem entrada em fase S (PURANAM et al, 1993) ou que possam estar envolvidos com a B-catenina intracelular no início da endoreduplicação em células binucleadas pela ativação de tais genes.

Segundo Hernandez-Blazquez et al., (2001) o tráfego de conexinas e a formação de placas junctionais tipo gap são controladas pela função da E-caderina. Em seu trabalho as duas conexinas 26 e 43 estavam localizadas na região do retículo endoplasmático. A E-caderina pode movimentar conexinas preexistentes para formar junções tipo gap sem necessidade de síntese de novas proteínas. A presença de E-caderina nas membranas celulares em meio pobre em cálcio não é suficiente para iniciar o movimento das conexinas, mas depois da mudança do meio de cultura para rico em cálcio a E-caderina aumentou na zona de contato intercelular. A união das membranas contíguas mediada pela E-caderina é um evento rápido, sendo já observado 20 minutos após a mudança para meio rico em cálcio, de maneira semelhante à E-caderina imunopositivamente à B-catenina foi encontrada entre as membranas alinhadas de células adjacentes. A determinação da formação das junções de adesão são estimuladas pela mudança para meio rico em cálcio, os autores utilizaram anticorpos anti B-catenina em ambas condições em meio pobre e rico em cálcio. Em cultura pobre em cálcio a B-catenina foi observada no citoplasma periférico, mas não na membrana plasmática. Doze horas depois em meio rico em cálcio, a mesma proteína foi observada na zona de contato intercelular. Não foram observadas junções intercelulares em condições pobre em cálcio, contudo, após a mudança do meio para meio rico em cálcio as junções de adesão foram frequentemente observadas. Após a mudança do meio de cultura para meio rico em cálcio inicia-se uma série de eventos correlacionados e mediados pela E-caderina tendo como consequência a liberação de conexinas de seu estado estacionário na cisterna do retículo endoplasmático. Através de experimento concluiu-se que o aparelho de golgi é o próximo passo obrigatório no movimento de ambas as conexinas após a ativação da E-caderina em células. Observações feitas ao microscópio eletrônico de que microfilamentos são mais frequentes em meio rico em cálcio sugere que as fibras de actina possuem um papel ativo no transporte das conexinas possivelmente induzido pela ação da E-caderina. A adesão celular ocorre mesmo sem filamentos de actina isso indica que impedindo a

construção da rede de filamentos de actina, interrompe-se o movimento das conexinas pela E-caderina.

A localização da E-caderina na membrana plasmática após a transferência da Cx26 induz a localização de tipos mutantes de B-catenina na membrana plasmática, conduzindo diminuição de catenina e supressão de B-catenina dependente induzindo sinalização para crescimento celular (YANO et al. 2001). Assim a expressão de E-caderina na membrana celular é importante na regulação da B-catenina. Mais tarde foi demonstrado que a Cx26 possibilita regulação da expressão da B-catenina e esta é dependente da sinalização celular. Demonstrou-se previamente que a E-caderina é requerida para o estabelecimento da junção (JONGEN et al., 1991; MEYER et al., 1992). Recentemente obtivemos evidências que a E-caderina é essencial para o transporte da Cx26 e Cx43 e formação de junção gap em células epiteliais de camundongo (YANO et al. 2001).

6.7 HORMÔNIOS

Em cultivo celular sob condições apropriada as células poderão viver, multiplicar-se e até mesmo expressar propriedades particulares. Estas células podem ser observadas ao microscópio ou analisadas bioquimicamente, os efeitos da adição ou remoção de moléculas específicas, tais como hormônios ou fatores de crescimento podem ser explorados. Os efeitos dos hormônios são complexos, mas suas funções podem ser divididas em três grandes categorias. Alguns hormônios alteram a permeabilidade da membrana celular, outros podem alterar a atividade de enzimas e, alguns estimulam a liberação de outros hormônios. Estudos recentes demonstraram que os efeitos mais prolongados dos hormônios acabam por resultar na ativação de genes específicos. Quando um hormônio esteróide entre uma célula se liga a um receptor no citoplasma da outra se torna ativo e penetra no núcleo onde se liga a áreas específicas do ácido desoxirribonucleico (DNA). Isso ativa alguns genes e desativam outros, alterando a atividade da célula. Os hormônios também regulam ácidos ribonucleicos (RNA), em síntese de proteínas. Um mesmo hormônio pode afetar tecidos de forma diferente daquela com que afetaria outro tecido em diferentes épocas

da vida, tecidos celulares estão programados para responder de forma diferente ao mesmo hormônio. Para aumentar ainda mais essa complexidade, alguns efeitos induzidos por hormônios podem exigir ação de mais de um hormônio. Este complexo sistema propicia controles de segurança, forma que, em caso de deficiência de um determinado hormônio outros o compensarão (FRESHNEY, 1994).

6.7.1 Progesterona

Nossos resultados mostram que com adição de progesterona para ambas as conexinas 32 e 43 houve aumento gradativo na sinalização sendo o último terço gestacional a fase de maior intensidade na expressão, essa sinalização poderia propiciar estímulo aos receptores localizados nas células trofoblásticas em cultura. Recentemente foi demonstrado que a progesterona regula a expressão do gene e aumenta hCG (OMIGBODUM et al., 1997). Durante a gestação ocorre aumento dos vilos trofoblásticos para diferenciação celular, nas fases mais avançadas o sinciciotrofoblasto é o principal determinante para o desenvolvimento da placenta e crescimento fetal (BENIRSHKE; KAUFMANN, 1990).

6.7.1.1 Conexina 32

Nas placas as quais adicionamos hormônios grupo I, surpreendentemente as células trofoblásticas passaram a expressar Cx32 no citoplasma em pequena quantidade, sendo esta a primeira descrição do efeito hormonal sobre conexinas em células da placenta bovina. No grupo II a intensidade aumenta permanecendo ainda no citoplasma, no grupo III a expressão fica mais forte. Quando comparamos com a cultura celular pura, ou seja, sem adição de hormônios para Cx32 notamos que com adição de progesterona o mesmo grupo I apresentou expressão da conexina, o que não foi visto no mesmo grupo I em cultura pura. O estímulo para a expressão da Cx32 em fases mais tardias, pode ser o crescimento do trofoblasto (WINTHERHAGER, et al.,

1988; ANTOSKIEWICZ et al., 1996) e pode estar relacionado ao aumento da presença de receptores de esteróides hormonais do endométrio (ORSINO et al., 1996). Verificamos que a expressão da Cx32 só é vista após o período que caracteriza a implantação completa do embrião no endométrio ou com adição de hormônios como foi em nossa cultura. A ausência da expressão da Cx32 no grupo I sem adição de hormônios se deve ao fato da conexina ser especificamente encontrada no endométrio uterino. Durante o processo de implantação do conceito o hormônio luteinizante inicia produção de células luteínicas com formação de corpo lúteo no ovário produzindo progesterona responsável pela implantação e manutenção da gestação até a sinalização das glicoproteínas associadas à gestação ao endométrio, produção de prostaglandina e involução do corpo lúteo (HOFFMANN; SCHULER, 2002).

A célula binucleada é considerada a principal produtora de progesterona entre as células do trofoblasto (REIMERS et al., 1985) que entram em contato com as células do epitélio caruncular até a membrana basal (WOODING; WANTHES, 1980). A transferência direta de progesterona pela placenta no estroma caruncular e migração das CGTB foi sugerida por Reimers et al., (1985). No endométrio, a progesterona é considerada comumente como oponente clássica do estrógeno, contrariando os efeitos de proliferação (SONG; FRASER, 1995; MOYER; FELIX, 1998). Porém, em contato com outros fatores, a progesterona estimula também proliferação de células do estroma endometrial em baixas condições *in vitro* (IRWIN et al., 1991; PIVA et al., 1996). O placentônio próximo ao parto está aparentemente sensível à progesterona, assim problemas relativos ao curso do parto ou retenção da placenta pode resultar na retenção imprópria de progesterona no local. Esta sugestão é apoiada por resultados obtidos em vacas nas quais o parto foi induzido com antiprogesterona em contraste ao que aconteceu com o uso de prostaglandina ou glicocorticoides que influenciam retenção placentária (LI et al., 1991). A presença de receptores para progesterona foi descoberta em periócitos capilares associado a paredes de artérias, sugerindo que possa estar envolvida na regulação dos locais de angiogênese caruncular e/ou fluxo sanguíneo através de mecanismos diretos ou indiretos. Em nosso material, constatamos que houve aumento gradativo dos níveis de expressão das conexinas 32 e 43 nas placas com progesterona a partir do grupo I até o grupo III.

6.7.1.2 Conexina 43

No grupo I observamos que a expressão de fluorescência foi menor, aumentando para o grupo II onde é vista ao redor do núcleo sem sobrepor-lo, contudo no grupo III a conexina mostra intensa expressão por sobre o núcleo da célula. A migração da CGT em placentônios bovinos pode ser influenciada pelas conexinas 26 e 43 uma vez que o RNAm e a proteína são expressadas em CGT (PFARRER et al., 2006). Embora o RNAm para Cx32 esteja presente a proteína não é observada no início da implantação sugerindo a não tradução da Cx32 no grupo I. O trofoblasto tem propriedade invasiva apenas para determinado período de desenvolvimento da placenta (GROSS et al., 1994). A perda temporária na expressão da conexina é importante para o grau de invasão do trofoblasto (WINTERHAGER, et al., 1999).

Existem fortes indícios na literatura que sugerem que a expressão da conexina 43 pode ser influenciada por hormônios sexuais. No miométrio, a expressão da conexina 43 é controlada pelo estrógeno e pela progesterona, sendo estimulada pelo estrógeno e reprimida pela progesterona (DAHL; BERGER; 1978; DAHL; ARZANIA; WERNER, 1981; GARFIELD, SIMS, DANIEL; 1977; WINTERHAGER et al., 1991; LYE et al., 1993). O estímulo do aumento da expressão do gene da Cx43 no miométrio parece ocorrer por intermédio do aumento da expressão de uma proteína chamada Ini, a qual por sua vez é expressa sob o estímulo do estrógeno. Esta proteína (Ini) liga-se ao promotor da Cx 43, estimulando a atividade de transcrição deste gene (OLTRA et al., 2003).

O fato de termos encontrado aumento da expressão da Conexina 32 e 43 nas células gigantes trofoblásticas sugere que nestas células as expressões destas conexinas também estão sob o controle dos hormônios sexuais.

6.7.2 Estrógeno

A presença de estrógeno na cultura induziu mudança notável na comunicação das células trofoblásticas, caracterizando aumento no número de células aderidas (CRONIER et al., 1999). Em nosso experimento também notamos aumento das conexinas 32 e 43 após adição de estrógeno com maior expressão no último terço gestacional onde observamos as conexinas localizadas na região sobre o núcleo que se desloca para o citoplasma no terceiro terço gestacional. Em contraste segundo Cronier et al., (1999) não havia receptores na comunicação celular trofoblásticas humanas em cultura na presença de progesterona, não ocorrendo processos de diferenciação celular. Com aumento de estrógeno, ocorreu intensa expressão da Cx43 desencadeando formação de hCG após alguns dias de cultivo suficiente para acelerar diferenciação celular (CRONIER et al., 1999; LYE et al., 1993). Isso mostra que o gene da Cx43, contém uma série de elementos em resposta ao estrógeno na região promotora. Os efeitos do estrógeno na cultura aumentam as comunicações celulares, que são as principais funções das junções comunicantes no controle da interação metabólica. Várias observações indicam que a célula através de comunicação transfere metabólicos e informações moleculares, caracterizando importante papel no controle de proliferação celular e desenvolvimento embrionário (LOEWENSTEIN; ROSE, 1992). O estrógeno aumenta a expressão do gene 17 β -estradiol, estimula a fisiologia e bioquímica da célula e diferenciação morfológica do trofoblasto (CRONIER et al., 1999).

6.7.2.1 Conexina 32

No grupo I verificamos expressão muito fraca em algumas células, porem em outras a expressão se intensifica, mas a expressão está voltada lateralmente ao núcleo, o mesmo acontece em relação à intensidade da expressão para o grupo II. No grupo III a expressão intensifica-se sendo visível ao redor das células e sobre alguns núcleos. Com base nas observações da expressão da Cx32 a mesma é baixa desencadeando pouca expressão no grupo I quando

comparada com a Cx43, a partir do grupo II a expressão aumenta até o terço final na gestação atingindo maior expressão no momento do parto.

6.7.2.2 Conexina 43

No grupo I observamos expressão média quando comparada com os dois outros grupos. O grupo II é o que possui expressões mais fraca, ficando o grupo III com a maior intensidade da expressão da conexina. A partir do grupo I a expressão da Cx43 em resposta à indução de estrógeno aumenta gradativamente até o terço final da gestação, mas permanecendo sempre em níveis mais baixos que nos testes com progesterona, ocorrendo aumento abrupto na presença de estrógeno apenas no grupo III, ou antes, do parto. Foi demonstrado que o estrógeno possa estar envolvido na excitação da contração uterina durante a liberação da placenta (MCGOVEN et al., 1992; YALLAMPALLI; GARFIELD, 1994).

6.7.3 Progesterona/ Estrógeno

Durante a gestação são produzidos constantemente progesterona e estrógeno pela junção materno fetal, o estrógeno estimula condições de diferenciação morfológica da célula de citotrofoblasto em sinciotrofoblasto (CRONIER et al., 1999). Em seu trabalho Cronier et al., (1999) apóiam o papel do estrógeno na maturação da placenta ao término da gestação. O que para nós é perceptível quando analisamos as placas que contêm estrógeno e vemos que houve aumento gradativo da expressão para ambas as conexinas 32 e 43 a partir do grupo I, intensificando-se no grupo III, este achado também é válido para o conjugado progesterona/ estrógeno, porém a maior intensidade de expressão foi vista para Cx43. Isso reforça a hipótese de que o estrógeno tem papel central e integrativo no regulamento, desenvolvimento e diferenciação funcional do trofoblasto (CRONIER et al., 1999).

6.7.3.1 Conexina 32

A ação da progesterona combinada ao estrógeno não tem influência sobre a expressão da Cx32 no grupo I da mesma forma que a progesterona e o estrógeno adicionados isoladamente ao meio de cultura sendo a expressão da Cx32 para a progesterona visível no citoplasma da célula em pequena quantidade e para o estrógeno a expressão é fraca em algumas células e em outras a expressão está voltada lateralmente ao núcleo. O grupo II mostra a maior intensidade da conexina sobre o núcleo da célula. O grupo III a expressão da conexina é vista sobre o núcleo. A função dos esteróides na placenta bovina é largamente desconhecida, mas sabe-se que o estrógeno e a progesterona são fatores importantes que controlam o crescimento da carúncula e diferenciação celular (HOFFMANN; SCHULER, 2002).

6.7.3.2 Conexina 43

O grupo I apresenta expressão da conexina lateralmente ao núcleo. O grupo II mostra a conexina ao redor do núcleo nesta fase os núcleos celulares apresentam formação de grânulos de heterocromatina. No grupo III a conexina se mostra sobre o núcleo com formação de grânulos e heterocromatina visíveis. Alguns autores sugeriram que a diminuição de progesterona e elevação correspondente de estrógeno próximo ao parto seja responsável pelo aumento de receptores de estrógeno e aumento da contratibilidade uterina (YALLAMPALLI; GARFIELD, 1994) e que a retenção das membranas fetais está associada a alteração no estado do receptor (BOSS et al., 2000). Achados surpreendentes nos últimos anos indicam que a conexina possui funções específicas que não envolvam apenas canais intercelulares e reciprocamente as conexinas não são as únicas proteínas capazes de formar canais intercelulares. Estudos, no entanto sugerem que hemicanais de conexina possam atuar unicamente na membrana plasmática e introduzir grande condutância iônica alterando dramaticamente a propriedade da permeabilidade individual da célula, esta atividade foi associada a número surpreendente de eventos fisiológicos.

A expressão da conexina 32 e 43 é hormonalmente regulada pelo estrógeno e progesterona durante a implantação no endométrio, assim a relação dos padrões de expressão do gene de diferentes conexinas difere das diferentes fases de implantação. Isto levanta a pergunta sobre a capacidade de influência dos hormônios na expressão gênica da conexina. Há pouca informação disponível sobre reais mecanismos envolvidos no regulamento da expressão gênica da conexina no endométrio em resposta a hormônios maternos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Face ao exposto podemos concluir que:

- Todas as CGT em cultura expressam as conexinas 32 e 43 no seu citoplasma nos três terços gestacionais, com exceção da Cx32 no primeiro terço gestacional cuja expressão está condicionada à presença de hormônios sexuais.
- A Cx43 está presente no núcleo da CGTT no terceiro terço gestacional.
- As conexinas 32 e 43 são expressadas em maior quantidade no citoplasma das CGTs na terceira fase gestacional em cultura.
- As conexinas 32 e 43 podem ser utilizadas como marcadores celulares de CGT de placenta bovina, visto que estas células a expressam no epitélio placentário.
- A expressão das conexinas 32 e 43 são influenciadas pela presença de hormônios sexuais em condições de cultura.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- AL-LAMKI, R. S.; SKEPPER, J. N.; BURTON, G. J. Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 449-504, February 1999.
- AMOROSO, E. C. Placentation. In: PARKES, A. S. **Marshall's Physiology of Reproduction**. 3.ed London: Longmans Green, 1952. p. 127-331.
- ANTHONY, R. V.; LIANG, R.; KAYL, E. P.; PRATT, S. L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. **Journal Reproduction Fertility**. v. 49 (Suppl.) p. 83-95, 1995. Supplement.
- ANTOSKIEWICZ, A.; MULLER, G.; GRUMMER, R.; WINTERHAGER, E. Introduction of connexin 32 expression by potential embryonic signals in rabbit uterine epithelium. **Early Pregnancy**. v. 2, p. 253-263, 1996.
- BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 4, p. 385-393, 1993.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon-tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal Reproduction Immunology**. v. 37, p. 412-420, 1997.
- BENIRSHKE, K.; KAUFMANN, P. **The Pathology of the Human Placenta**. pp. 22-70. New York: Springer Verlag. 1990.
- BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin 43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. **Journal Cell Biology**, v. 107, p. 2621-2629, 1987.
- BJORKMAN, N.; SOLLEN, P. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 1, n. 4, p. 347-362, 1960.
- BJORKMAN, N. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentomes. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 24, p. 249-58, 1968.
- BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentaome. **Anatomical Record**, New York, v. 163, n. 1, p. 17-29, jan. 1969.
- BJÖRKMAN, N. **An Atlas of placental fine structure**. London: Baillière Tindall; Cassel, 1970, 96 p.
- BOOS, A.; JANSSEN, V.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 468-480, Oct. 2003.

BOOS, A.; KOHTES, J.; STELLJES, A.; ZERBE, H.; THOLE, H. Immunohisto-chemical assesment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 120, p. 351-360, 2000.

BOSCH, R. V. Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo. 2006. 86 f. **Dissertação** (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BORSBERRY, S.; BOBSON, H. Periparturient diseases and their effects on reproductive perfomance in five dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 124, n. 9, p. 217-219, Mar. 1989.

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

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; PAUL, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signalling. **Europian Journal Biochemistry**, v. 238, p. 1-27, 1996.

BURTON, G. J.; SAMUEL, C. A.; STEVEN, D. H. Ultraestructural studies of te placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. **Quart. Journal Physiology**, v. 61, p. 175-286, 1976.

BUULTJENS, T. E.; FINBOW, M. E.; LANE, N. J.; PITTS, J. D. Tissue and species conservation of the vertebrate and arthoropod forms of the low molecular weight (16-18000) proteins of gap junctions. **Cell Tissue Research**, v. 251, n. 1, p. 571-580, 1988.

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

CARVALHO, I. **Expressão e distribuição da conexina 43 nas células trofoblásticas gigantes bovinas em três fases gestacionais**. 2004. 106 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CHALLIS, J. R.; LYE, S. J. Parturition. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven, 1994. p. 985-1018.

CHEW, B. P.; KELLER, H. F.; ERB, R. E.; MALVEN, P. V. Periparturient concentracions of prolactin, progesterone and the estrogens in blood plasma of cows retaining and not retaining fetal membranes. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 44, n. 6, p. 1055-1060, June. 1977.

CRONIER, L.; ASAT, E.; HERVÉ, J. C.; DÉLESE, J.; MALASSINÉ, A. Dexametasone stimulates gap junctional communication peptide hormone productions and differentiation in human trophoblast. **Placenta**, v. 17, p. 44, 1996.

CRONIER, L.; BASTIDE, B.; DEFAMIE, N.; NIGER, C.; POINTIS, G.; GASC, J. M.; MALASSINE, A. Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 1, p. 285-295, 2001.

CRONIER, L.; BATISTA, B.; HERVE, J. C.; DELEZE, J.; MALASSINE, A. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. **Endocrinology**, v. 135, p. 402-408, 1994.

CRONIER, L.; DEFAMIE, N.; DUPAYS, L.; THÉVENIAU-RUISSY, M.; GOFFIN, F.; POINTIS, G.; MALASSINÉ, A. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, p. 101-109, 2002.

CRONIER, L.; GUIBOURDENCHE, J.; NIGER, C.; MALASSINE, A. Oestradiol Stimulates Morphological and Functional Differentiation of Human Villous Cytotrophoblast **Placenta**, v. 20, p. 669-676, 1999.

CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFER, C. J.; SMITH, R. D.; KRONFELD, D. S. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in holstein cows. **Journal of Dairy Science**. Savoy, v. 68, n. 9, p. 2347-2360, Sept. 1985.

DAHL, G.; BERGER, W. Nexus formation in the myometrium during parturition and induced by estrogen. **Cell Biology Int Rep**, v. 2, p. 381-387, 1978.

DAHL, G.; ARZANIA, R.; WERNER, R. Induction of cell-cell channel formation by mRNA. **Nature** v. 289, p. 683-685, 1981.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, D. H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine placental interface. **Placenta**, v. 21, p. 194-202, 2000.

DENKER, H. W. Implantation: a cell biological paradox. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 541-558, 1993.

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

DUC-GOIRAN, P. MIGNOT, T. M.; BOURGEOIS, C.; FERRÉ, F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. **European Journal of Obstetric & Gynecology and Biology**, v. 83, p. 85-100, 1999.

DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R. D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, v. 119, p. 1351-1355, 1986.

DUFLOT-DANCER, A.; MESNIL, M.; YAMASAKI, H. Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes. **Oncogene**, v. 15, p. 2151-2158, 1997.

- EILER, H. Retained placenta. In: YOUNGQUIST, R. S. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 340-348.
- ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N. Comparative placental structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, p. 3-15, 1999.
- ERB, H. N.; MARTIN, S. W.; ISON, N.; SWAMINATHAN, S. Interrelationship between production and reproductive diseases in holstein cows, path analysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 64, n. 2, p. 282-289, Feb. 1981.
- FLINT, A. P. Interferon, the oxytocin receptor and maternal recognition of pregnancy in ruminants and non-ruminants: a comparative approach. **Reproduction Fertility. Development** v. 7, p. 313-318, 1995.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. New York: Wiley-Liss. Ed. 3. 1994. 486 p.
- GABRIEL, S.; WINTERHAGER, E.; PFARRER, C.; TRAUB, O.; LEISER, R. Modulation of connexin expression in sheep endometrium in response to pregnancy. **Placenta**, v. 25, p. 22-27, 2004.
- GIEPMANS, B. N.; MOOLENAAR, W. H. The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ, the zona occludens-1 protein. **Curr. Biology**, v. 8, p. 931-934, 1998.
- GARFIELD, R. E.; SIMS, S.; DANIEL, E. E. Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. **Science**, v. 198, p. 958-960, 1997.
- GLASSER, S. R.; CLARK, J. H. A determinant role of progesterone in the development of uterine sensitivity to decidualization and ovo-implantation. In: MERKERT, C. L.; PAPACONSTANTINOS, J. (Ed). **The 33 rd symposium of the society for development biology**: The Development Biology of Reproduction. Academic Press, 1975.
- GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 7, p. 1260-1268, July. 1997.
- GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. **Annu Rev Biochemistry**, v. 65, p. 475-502, 1996.
- GRACE, N. D.; WATKINSON, J. H.; MARTINSON, P. L. Accumulation of minerals by the fetus conceptus of single and twin bearing ewes. **N.Z.J. Agriculture Research**, v. 29, p. 207-222, 1986.
- GREEN, J. A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 1624-1631, 2000.

GROSS, D.; JARRY-GUICHARD, T.; TEN VELDE, I.; DE MAZIERE, A.; VAN KEMPEN, M. J. A.; DAVENST, J.; BRIAND, J. P.; MOORMAN, A. F. M.; JONGSMA, H. J. Restricted distribution of connexin 40, a gap junctional protein, in mammalian heart. **Cancer Research**, v. 74, p. 839-851, 1994.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. The fetal placental binucleate cell as a regulator of placental prostaglandin synthesis. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 77, 1986. Supplement.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. P.; MANSPEAKER, J. E.; LEWIS, G. S.; RUSSEK-COHEN, E. Bovine placental synthesis in vitro as it relates to placental separation. **Prostaglandins**, v. 34, n. 6, p. 903-917, 1987.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F.; MANSPEACKER, J. E. In vitro placental prostaglandin synthesis in the late pregnant and peripartum cow. **Biology of Reproduction**, New York, v. 32, n. 1, p. 154, Feb. 1985.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F.; MORELAND, T. W. Prevention of the retained fetal membranes syndrome (retained placenta) during induced calving in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 26, p. 365-370, 1986.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. **Biology Reproduction**, v. 38, p. 1027-1034, 1988.

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

GRÜMMER, R.; CHWALISZ, K.; MULHOLLAND, J.; TRAUB, O.; WINTERHAGER, E. Regulation of connexin 26 and connexin 43 in rat endometrium by ovarian steroid hormones. **Biology Reproduction**, v. 51, p. 1109-1116, 1994.

GRUNERT, E. Etiology of retained bovine placenta. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 237-242.

GRUNERT, E. Placental separation/retention in the bovine. **International congress on animal reproduction artificial insemination**, Illinois, v. 6, n. 11, p. 17-24, June. 1984.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal Reproduction Fertility**, v. 49, p. 39-51, 1995.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 217-240.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; JOAZEIRO, P. P.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Control of intracellular movement of connexins by e-cadherin in murine skin papiloma cells. **Experiment Cell Biology**, v. 270, p. 235-247, 2001.

- HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 309-320, 2002.
- HOLM, L. W.; SALVATORE, C.; ZEEK-MINING, P. The post term bovine placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 88, n. 4, p. 479-489, Feb. 1964.
- HOUGHTON, F. D.; BARR, K. J.; WALTER, G.; GABRIEL, H. D.; GRUMMER, R.; TRAUB, O.; LEESE, H. J. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1403-1412, 2002.
- HUNTER, J. T.; FAIRCLOUGH, R. J.; PETERSON, A. J.; WELCH, R. A. S. Fetal and maternal hormonal changes preceding normal bovine parturition. **Acta Endocrinologica**, Oslo, v. 84, n. 3, p. 653-662, Mar. 2003.
- HUNYADY, B.; KREMPELS, K.; HARTA, G.; MEZEY, E. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. **Journal Histochemistry Cytochem**, v. 44, p. 1353-1362, 1996.
- IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas – A minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 1, p. 1-14, 2005.
- IRWIN, J. C.; UTIAN, W. H.; ECKERT, R. L. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. **Endocrinology**, v. 129, p. 2385-2392, 1991.
- JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestation, prenatal physiology and parturition. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproduction in Farm Animals**, 6. ed. Philadelphia: Lea; Febiger, 1993. p. 213-236.
- JEFFREY, J. J.; EHLICH, L. S.; ROSWIT, W. T. Serotonin: an inducer of collagenase in myometrial smooth muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, New York. v. 146, n. 3, p. 399-406, Mar. 1991.
- JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; JOYCE, M. M.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; GRAY, C. A.; PFARRER, C. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45 kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 92-98, 2003.
- JONGEN, W. M. F.; FITZGERALD, D. J.; ASAMOTO, M.; PICCOLI, C.; SLAGA, J. T.; GROS, D.; TAKEICHI, M.; YAMASAKI, H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. **Journal Cell Biology**, v. 114, p. 545-555, 1991.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**, 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1997.

- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 26, n. 4, p. 239-257, Aug. 1972.
- KIDDER, G. M.; WINTERHAGER, E. Intercellular communication in preimplantation development the role of gap junctions. **Frontiers in Biociencia**, v. 2, p. 53-64, 2001.
- KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 17-30, 1982. Supplement.
- KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentomes from days 20 to 29 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 1, p. 95-100, 1980.
- KLISCH, K.; BEVILACQUA, E.; OLIVEIRA, L. Mitotic polyploidization in trophoblast giant cells of the alpaca. **Cells Tissues Organs**, v. 181, p. 103-108, 2005.
- KLISCH, K.; HECT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 20, n. 5, p. 451-458, 1999b.
- KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Tripolar acytokinetic and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentomes: different modes of generation of multinuclear cells. **Anatomical Embryol**, v. 200, p. 229-237, 1999a.
- KOJIMA, T.; SAWADA, N.; CHIBA, H.; KOKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; URBAN, M.; LEE, G. H.; HERZBERG, E. L.; MOCHIZUKI, Y.; SPRAY, D. C. Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes, connexin 32 interacts with occludin. **Biochem. Biophys. Research Commun**, v. 9, p. 222-229, 1999.
- KORDTS, E.; JOCHLE, W. Induced parturition in dairy cattle: a comparison of a corticoid (flumethasone) and prostaglandin (PGF2) in different age groups. **Theriogenology**, New York, v.3, n. 4, p. 171-178, April. 1975.
- LAMMING, G. E.; WATHES, D. C.; FLINT, A. P. F.; PAYNE, J. H.; STEVENSON, K. R.; VALLET, J. L. Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. **Journal Reproduction Fertility**, v. 105, p. 165-175, 1995.
- LANDIM JR, L. P.; MIGLINO, M. A.; PFARRER, C.; AMBROSIO, C. E.; GARCIA, J. M. Culture of mature trophoblastic giant cells from bovine placentomes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 357-364, 2007.
- LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. **Veterinary Record**, London, v. 139, n. 19, p. 465-471, Nov. 1996.

- LEE, C. S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. R. Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placentae of the deer and cow using the monoclonal antibody, SBU-3. **Journal of Anatomy**, v. 147, p. 163-179, 1986.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental Structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.
- LEME dos SANTOS, H. S. **Embriologia comparada. Texto e atlas**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 189 p.
- LEWING, F. J.; PROULX, J.; MAPLETOFT, R. J. Induction of parturition in the cow using cloprostenol and dexamethasone in combination. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 26, n. 10, p. 317-322, 1985.
- LINDELL, J. O.; KINDHAL, H.; EDVIST, L. E. Prostaglandin release at dexamethase induced parturitions in cows. **Acta Veterinária Scandinava**, Vanlose, v. 18, n. 2, p. 257-265, 1977.
- LI, Y. F.; PEREZGROVAS, R.; GAZAL, O. S.; SCHWABE, C.; ANDERSON, L. L. Antiprogestosterone, RU 486, facilitates parturition in cattle. **Endocrinology**, v. 129, p. 765-770, 1991.
- LOEWENSTEIN, W. R.; ROSE, B. The cell-cell channel in the control of growth. **Semin Cell Biology**, v. 3, p. 59-79, 1992.
- LYE, S. J.; NICHOLSON, B. J.; MASCARENHAS, M.; MACKENZIE, L.; PETROCELLI, T. Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. **Endocrinology**, v. 132, p. 2380-2386, 1993.
- MACKENZIE, L. W.; CARFIELD, R. E. Hormonal control of gap junction in the myometrium. **American Journal Physiology**, v. 248, p. 296-308, 1985.
- MALARD, P. F.; BARRETO FILHO, J. B.; SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas zebu ao longo da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 5, p. 553-558, Out. 1996.
- MARQUES JUNIOR, A. P.; BARRETO FILHO, J. B.; SATURNINO, H. M. Aspectos morfológicos da placenta de vacas zebu (*Bos taurus indicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 213-219, Abr. 1993.
- MARQUES JÚNIOR, A. P. **Leucocyte chemotaxis activity cotyledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta**. 182 p. Tese (PhD). Urbana: University of Illinois, 1988.

- MARTAL, J.; CHENE, N.; CAMOUS, S.; HUYNH, L.; LANTIER, F.; HERMIER, P.; L'HARIDON, R. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 355-380, 1997.
- MARTINS, E. **Apoptose na maturação e eliminação placentária em *Bos taurus taurus***. 1999. 134 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- MARTINS, V. M. V.; MARQUES JUNIOR, A. P.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, E.; SANTOS, R. L.; LIMA, F. P. C. Maturação e expulsão placentária em vacas das raças Holandesa e Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 157-167, Abr. 2004.
- MARTINS, V. M. V.; Maturação e expulsão placentária em *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. 1999. 110 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- MATAMOROS, R. A.; CAAMANO, L.; LAMB, S. V.; REIMERS, T. J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. **Biology Reproduction**, v. 51, p. 486-492, 1994.
- McDIARMID, S. C. Induction of parturition in cattle using corticosteroid: a review. Part I. Reasons for induction, mechanisms of induction and preparations used. **Animal Breeding Abstracts**, Budapest, v. 51, n. 6, p. 404-419, June 1983.
- MCGOVERN, P. G.; GOLDSMITH, L. T.; SCHIMDT, C. L.; VON HAGEN, S.; LINDEN, M.; WEISS, G. Effects of endothelin and relaxin on rat uterine segment contractility. **Biology Reproduction**, v. 46, p. 680-685, 1992.
- MEHTA, P. P.; BERTRAM, J. S.; LOEWSTEIN, W. R. GROWTH inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. **Cell**, v. 44, p. 187-196, 1986.
- MERTO, G. R.; CELLA, N.; HYNES, N. E. Apoptosis is accompanied by changes in bcl-2 and bax expression, induced by loss of attachment, and inhibited by specific extracellular matrix proteins in mammary epithelial cells. **Cell Growth Different**, v. 8, p. 251-260, 1997.
- MESNIL, M.; YAMASAKI, H. Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: Evidence and hypothesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 7, p. 14-17, 1995.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6. ed. Porto Alegre. RS: Editora Sulina. Brasil. 1987. v. 1, p. 314.
- MEYER, R. A.; LAIRD, D. W.; REVEL, J. P.; JOHNSON, R. G. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. **Journal Cell Biology**, v. 119, p. 179-189, 1992.

- MORAIS-PINTO, L. **Caracterização da célula binucleada em placentas de vacas Nelore (*Bos indicus* LINNAEUS, 1758)**. 2002. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MORGAN, G.; WOODING, F. B. P. Cell migration in the ruminant placenta a freeze fracture study. **Journal Ultrastructural Research**, v. 83, p. 148-160, 1983.
- MORGAN, G.; WOODING, F. B.; BECKERS, J. F.; FRIESEN, H. G. An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. **Journal Reproduction Fertility**, v. 86, p. 745-752, 1989.
- MOYER, D. L.; FELIX, J. C. The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. **Conception**, v. 57, p. 399-403, 1998.
- MUSIL, L. S.; BEYER, E. C.; GOODENOUGH, D. A. Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens, molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation. **Journal Membr. Biology**, v. 116, p. 2163–2175, 1990.
- MUSIL, L. S.; GOODENOUGH, D. A. Biochemical analysis of connexin 43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. **Journal Cell Biology**, v. 115, p. 1357-1374, 1991.
- MYAGKAYA, G.; VREELING-SINDELAROVA, H. Erythrophagocytosis by cells of the trophoblastic epithelium in the sheep placenta in different stages of gestation. **Acta Anatomica**, v. 95, p. 234-248, 1976.
- MYERS, D. A.; REIMERS, T. J. Purification and endocrine evaluation of bovine binucleate trophoblastic cells. **Journal Tissue Culture Methods**, v. 11, p. 1227-1236, 1988.
- NAKANO, H.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. **Cell Tissue Research**, v. 303, p. 263-270, 2001.
- NAKANO, H.; SHIMADA, A.; IMAI, K.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. The cytoplasmic expression of E-cadherin and B-catenin in bovine trophoblasts during binucleate cell differentiation. **Placenta**, v. 26, p. 393-401, 2005.
- NICHOLSON, S. M.; BRUZZONE, R. Gap junctions: getting the message through, **Curr Biology**, v. 7, p. 340-344, 1997.
- NODEN, D. M.; De LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals**. Baltimore: Williams; Wilkins, 1985. 274 p.
- NOEL, S.; HERMAN, A.; JOHNSON, G. A.; GRAY, C. A. STEWART, M. D; BAZER, F. W.; GERTLER, A. SPENCER, T. E. Ovine placental lactogen specifically binds to endometrial glands of the ovine uterus. **Biology Reproduction**, v. 68, p. 772-780, 2003.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V.; MARQUES JUNIOR, A. P. Apoptose em placentomas de zebuínos (*Bos taurus indicus*) e o processo de maturação e liberação placentária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 27, CONGRESSO PAULISTA DE VETERINÁRIA, 5. CONFERÊNCIA ANUAL DA SPMV, 55., 2000, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2000a.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V.; MARQUES JUNIOR, A. P. Maturação e eliminação placentária em *Bos taurus taurus* e apoptose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 27. CONGRESSO PAULISTA DE VETERINÁRIA, 5., CONFERÊNCIA ANUAL DA SPMV, 55. 2000. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2000b.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V.; MARQUES JUNIOR, A. P. Maturação e liberação placentária e bovinos e sua relação com apoptose. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 4, p. 513-525, Out/Dez. 2001.

OHTA, M.; OKANOUE, T.; TAKAMI, S.; NAGAO, Y.; MORI, T.; HORI, N.; OKA, M.; KAGAWA, K.; KASHIMA, K. Morphological alterations of gap junctions in phalloidin-treated rat livers. **Journal Gastroenterology**, v. 29, p. 172–179, 1994.

OLTRA, E.; PFEIFER, I.; WERNER, R. Ini, a small nuclear protein that enhances the response of the connexin 43 gene to estrogen. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3148-3158. 2003.

OMIGBODUN, A.; ZIOLKIEWICZ, P.; TESSIER, C.; HOYER JR.; COUTIFARIS, C. Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? **Endocrinology**, v.138, p. 4308–4315, 1997.

OMORI, Y.; MESNIL, M.; YAMASAKI, H. Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients : Functional defects and dominant negative effects. **Molecular Biology Cell**, v. 7, p. 907-916, 1997.

ORSINO, A.; TAYLOR, C. V.; LYE, S. J. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. **Endocrinology**, v. 137, p. 1545-1553, 1996.

PAGANO, R. E.; MARTIN, O. C. Use of fluorescent analogs of ceramide to study the Golgi apparatus of animal cells. In “Cell Biology, A Laboratory Handbook” (J. E. Celis, Ed.), Academic Press, San Diego. 1998. 180 p.

PAISLEY, L. C.; MICKELSEN, W. D.; ANDERSON, P. B. Mechanism and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. **Theriogenology**, New York, v. 25, n. 3, p. 353-381, Mar. 1986.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, A. F. Morfological aspects of placental haematomes of water buffalo placenta (*Bubalus bubalis bubalis* Linnaeus, 1758) **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 38, p. 151-154, 2001.

- PETROCELLI, T.; LYE, S. Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin 43, by estrogen and progesterone. **Endocrinology**, v.133, p. 284-290, 1993.
- PFARRER, C.; HIRSCH, P.; GUILLMONT, M.; LEISER, R. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. **Placenta**, v. 24, p. 588-597, 2003.
- PFARRER, C. D.; HEEB, C.; LEISER, R. Expression of gap junctional connexins 26, 32 and 43 in bovine placentomes during pregnancy. **Placenta**, v. 27, p. 79-86, Jan. 2006.
- PFARRER, C. D.; RUZIWA, S. D.; WINTHER, H.; LEISER, P.; CALLESEN, H.; SCHAMS, D. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGF-2 in bovine placentomes from implantation until term. **Placenta**, v. 3, p. 123- 133, 2005.
- PHYCHOYOS, A. Endocrine control of egg implantation. In: GREEP, R.O.; ASTWOOD, E. B.; GEIGER, S. R. (Ed.) **Hand book of physiology**. Washington DC. American Physiological Society, 1973. p. 187-215.
- PIVA, M.; FLIEGER, O.; RIDER, V. Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferations is progesterone dependent. **Biology Reproduction**. v. 55, p. 1333-1342. 1996.
- POTTER, D. D.; FURSHPAN, E. J.; LENNOX, E. S. Connections between cells of the development squid as revealed by electrophysiological methods. **Proc. natl. academi science**, USA. v. 55, p. 328-336, 1966.
- PUCK, J. M.; SNELLER, M. C. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. **Seminars in immunology**, v. 9, p. 77-84, 1997.
- PURANAM, K. L.; LAIRD, D. W.; REVEL, J. P. Trapping na intermediate form of connexin 43 in the golgi. **Experiment Cell Resarch**, v. 206, p. 85-92, 1993.
- PUTRO, P. P. Effects of intrauterine dilute iodine solution infusion on the incidence of retained placenta and endometritis in dairy cows. **Acta Veterinária Sacandinava**, Vanlose, v. 83, p. 58-65, 1988.
- QUINLAN, M. P.; HYATT, J. L. Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin–catenin complex in epithelial cells. **Cell Growth Differ**, v. 10, p. 839–854, 1999.
- RALPH, M. M.; LEE, C. S.; THORBURN, G. D. Identification and characterization of monolayer cultures of sheep trophoblast cells maintained in bicameral culture chambers. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 481-489, 1989.
- RAMSEY, E. M. **The placenta – human and animal**. New York: Praeger 1982.
- REIMERS, T. J.; ULLMANN, M.B.; HALSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trofoblastic cells. **Biology Reproduction**, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

- REXROAD Jr, C. E.; POWELL, A. M. Culture of blastomeres from in vitro-matured, fertilized, and cultured bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 48, p. 238-245, 1997.
- RIVEDAL, E.; YAMASAKI, H.; SANNER, T. Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 689-694, 1994.
- ROBERTS, R. M.; EARLY, A. D.; ALEXENKO, A. P. HAN, C. S.; EZASHI, T. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, p. 259-264, 1999.
- ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 3. ed. Ithaca: S. J. Roberts, 1971. 776 p.
- SAMAD, M. A.; RAHMAN, M. H.; ISLAM, T. S. Factors associated with placental retention in dairy cattle. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 42, n. 4, p. 720-723, Dec. 1989.
- SANTOS, R. L. **Estudo morfológico da placenta de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção**. 1995. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.
- SANTOS, R. L.; BARRETO-FILHO, J. B.; MARQUES, A. P.; ANDRADE, J. S., Erythrogocytosis in the caprine trophoblast. **Theriogenology**, v. 46, p. 1077-1083, 1996.
- SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P. Estudos histoquantitativos do placentomo de vacas leiteiras com liberação normal de placenta. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 4, n. 1, p. 39-42, 1998.
- SCHEIDEGGER, G. A., MELENDEZ, R. P., DUCHENS, A. N., AUSIN, H. J. Retensón de placenta y otras alteraciones reproductivas del puerpiero: su efecto sobre la fertilidad post-parto en bovinos Holstein. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.8, n.1, p. 18-23, 1993.
- SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 41-65, 1975.
- SCLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.145-160, 2000.
- SHIMADA, A.; NAKANO, H.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. isolation and characterization of a bovine blastocyst-derived trofoblastic cell line, Bt-1: devevelopment of a culture system in the absence of feeder cell. **Placenta**, v. 22, p. 652-662, 2001.
- SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Placental apoptosis in normal pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St Louis, v. 177, n. 1, p. 57-65, July, 1997.
- SONG, J. Y.; FRASER, I. S. Effects of progestogens on huma endometrium. **Obstet Gynecol Surv.** v. 50, p. 385-394, 1995.

- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factores regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 4-13, 2004. Supplement.
- SPENCER, T. E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Tau-interferon: pregnancy recognition in ruminants. **Proceed society experiment biololgy medical**, v. 21, p. 215-229, 1996.
- STEINBERG, T. H. Gap junction function. The messenger and the message. **American Journal Pathology**, v. 152, n. 4, p. 851-854, 1998.
- STEVEN, D. H. Anatomy of the placental barrier. In: STEVEN, D. H. (Ed.). **Comparative placentation**. London: Academic, 1975. p. 25-57.
- STEWART, M. D.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; SCHULER, L. A.; JOYCE, M. M.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine uterus. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 1779-1789, 2000.
- TALBOT, N.C.; POWELL, A.; GARRET, W.; EDWARDS, A.; REXROAD JR, C. Ultrastructural and karyotypic examination of in vitro produced bovine embryos developed in the sheep uterus. **Tissue & cell**. V. 32, n. 1, p. 9-27, 2000.
- THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal reconition of pregnancy. **Journal Reproduction Fertility**, v. 49, p. 15-28. 1995.
- TOYOFUKU, T.; YABUKI, M.; OTSU, K.; KUZUYA, T.; HORI, M.; TADA, M. Direct association of the gap junction protein connexin 43 with ZO-cardiac myocytes. **Journal Biology Chemistry**, v. 273, p. 12725–12731, 1998.
- VAN WERNEN, T.; SCHUKKEN, Y. H.; LLOYD, J. The effects of duration of retained placenta on reproduction milk production, postpartum disease and culling rate. **Theriogenology**, v. 37, p. 1191-1203, 1992.
- VASCONCELOS, A. C. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia Veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7. 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Editora da Fundação de Estudo em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1995. p. 69.
- WAGNER, W. C. Endocrine physiology of the parturient cow and placental retencion. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 1, p. 61-74, 1989. Supplement.
- WANGO, E. O.; WOODINHG, F. B. P.; HEAP, R. B. The role of trophoblast ic binucleate cell in implantation in the goat: a morphological study. **Journal 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 placental binucleate cells from sheep and goats. **Journal Endocrinology**, v. 129, p. 283-289, 1991.

WILLIAMS, W. F.; MARGOLIS, M. J.; MANSPEAKER, J.; DOUGLASS, L. W.; DAVIDSON, J. F. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. **Theriogenology**, v. 28, n. 2, p. 213-223, 1987.

WINSATT, W. A. Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal Anatomical**, v. 159, p. 109-243, 1980.

WINTERHAGER, E.; BRUMMER, F.; DERMIETZEL, R.; HULSER, D. F.; DENKER, H. W. Gap junction formation in rabbit uterine epithelium is response to embryo reconnection. **Development Biology**, v. 126, p. 203-211, 1988.

WINTERHAGER, E.; STUTENKEMPER, R.; TRAUB, O.; BEYER, E.; WILLECKE, K. Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. **European Journal Cell Biology**, v. 55, p.131-142, 1991.

WINTERHAGER, E.; VON-OSTAU, C.; GERKE, M.; TRAUB, O.; KAUFMANN, P. Connexin expression patterns in human trophoblast cells during placental development. **Placenta**, v. 20, n. 8, p. 627-638, Nov. 1999.

WOICKE, J.; SCHOON, H. A.; HEUWIESER, W.; SCHULZ, L. C.; GRUNERT, E. Morphological and functional aspects of placental maturation mechanisms in the cow. I. Light microscopy. **Zentralblatt Fuer Veterinaermedizin Reihe**, Berlin, v. 33, n. 9, p. 660-667, Nov., 1986.

WOODING, F. B. P. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of reproduction fertility**, n. 31. p. 31-9, 1982. Supplement.

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

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

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

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation, in G.E. Laming (Ed.), **Marshall's Physiology of Reproduction**. Chapman and Hall, London, 1994, Part 1, v. 3, p. 233-360.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F.; HEAP, R. B.; MORGAN, G.; BUTTLE, H. L.; YOUNG, I. R. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, n. 2, p. 499-512, 1986.

WOODING, F. B. P.; WALTHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentomes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 425-430, 1980.

- WOODING, F. B.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R. B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, v. 17, p. 75-86, 1996.
- WORHRL, W.; HÄCKER, G. Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA – fragmenting factor. **Biochemical Biophysical Research Communicatinos**, v. 254, n. 3, p. 552-558, Jan. 1999.
- YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E. Uterine contractile responses to endothelin-1 and endothelin receptors are elevated during labor. **Biology Reproduction**, v. 51, p. 640-645, 1994.
- YAMASAKI, H.; KATOH, F. Further evidence for the involvement of gap junctional intercellular communication in the induction and maintenance of transformed foci im BALB/c 3T3 cells. **Cancer Research**, v. 48, p. 3490-3495, 1988.
- YAMASAKI, H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 93, p. 191-197, 1991.
- YANO, T. HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. H.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Reduction of malignant of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p.1593-1600, 2001.
- ZIELER, C. G.; KESSLER, J. F.; SCHULER, L. A. Characterization of a novel prolactin-related protein from bovine fetal placenta. **Endocrinology**, v. 126, p. 2377-2382, 1990.
- ZOLI, A. P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J. F.; REZNIK, M.; BECKERS, A . Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 623-629, 1992.
- ZONTA, M.; ANGULO, M. C.; GOBBO, S.; ROSENGARTEN, B.; HOSSMANN, K. A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO, G. Neruron-to-astrocytes mediates glial calcium waves. **Nature Neuroscience**, v. 6, p. 43-50, 2003.