LAURA PACHECO ARTONI

**FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa
na placenta bubalina em diferentes fases da gestação**

São Paulo

2005

LAURA PACHECO ARTONI

FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na
placenta bubalina em diferentes fases da gestação

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2005

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

Efr
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
27/4/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1552
FMVZ

Artoni, Laura Pacheco

FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação / Laura Pacheco Artoni. – São Paulo : L. P. Artoni, 2005.
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Fatores de crescimento. 2. Imuno-histoquímica.
3. Proliferação celular. 4. Placenta. 5. Búfalos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Imunolocalização do FGF e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta da espécie bubalina em diferentes fases da gestação", protocolo nº540/2004, utilizando 13 amostras de placentôneos (bubalinos), sob a responsabilidade da Profª Drª Paula de Carvalho Pappa, 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 "Immunolocalization of the bFGF and its receptors in relation to proliferative activity in bubalin placenta during gestation", protocol number 540/2004, utilizing 13 bubalin, under the responsibility of Profª Drª Paula de Carvalho Pappa, 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, 08 de junho de 2005

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARTONI, Laura Pacheco

Título: FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“As melhores e mais belas coisas do mundo não podem ser vistas ou tocadas. Precisam ser sentidas com o coração.”

Helen Keller

Dedico esta dissertação de mestrado:

para meus pais **Sérgio Roberto Artoni e Leila Pacheco Artoni** que estiveram sempre presentes dando suporte para tudo que foi necessário, sem eles seria muito difícil concretizar este trabalho. Vocês são um exemplo a ser seguido. A vida fica muito melhor quando uma pessoa tem a sorte de ter pais maravilhosos, ainda bem que Deus me permitiu esta sorte. Vocês são os grandes amores da minha vida, minha inspiração, meu porto seguro. Eu dedico cada momento da minha vida a vocês.....

para meus avós maternos **José de Araújo Pacheco e Nyx Falco Pacheco (in memorian)**. Vovô, sem a sua força e o seu exemplo a ser seguido, jamais teria chegado aonde cheguei. Minha querida vovó foi quem me ensinou a ler e escrever e acho que desde aquele momento já imaginava que eu me tornaria a sua “doutorinha”. Vózinha, você mora dentro do meu coração. Vocês dois lutaram muito e hoje são dois grandes exemplos de força e determinação para toda a nossa família. Aos dois muito obrigada e um enorme beijo.....

para os meus avós paternos **João Artoni e Laura Bazoni Artoni** (ambos in memorian) porque mesmo ausentes sempre me ajudaram, de formas muitas vezes incompreensíveis... Sei que todos os dias quando acordo vocês estão de alguma forma, presentes.... Meus queridos, um grande beijo.....

para minha madrinha **Nené**, que dia a dia esteve presente na minha vida. Nené, muito do que eu sei hoje eu devo aos seus ensinamentos. Você é um exemplo a ser seguido por tudo e por todos. Espero poder compartilhar muitos outros momentos com você. Zinha, sem dúvida você é uma das pessoas mais importantes da minha vida.....

para meus irmãos **Netinho, Rafa e Lê**, vocês são os grandes amores da minha vida. Lembro com carinho de cada momento que passamos juntos. Não sei como seria a minha vida sem vocês ao meu lado. Seremos sempre um quarteto inseparável.....

para minhas tias, tio e primas: **Valdete**, que sempre me apoiou com sua presença me tornando mais feliz, **Vera**, que me ajudou em muitos momentos, sua presença foi muito importante, **Marisa**, que também sempre esteve ao meu lado, **Sheila** que me ajudou e **Juquinha**, que agora está lá em Natal (que lugar feio, heim...), mas que nunca deixou de estar presente na minha vida. Minhas primas **Dedé, Didi e Pati**, ou mais do que primas, minhas irmãs de coração. Bons momentos passamos ao lado uma das outras.....

A todos vocês muito obrigada.....

Oferecimento

*Ofereço esta dissertação de mestrado à minha orientadora Prof^a Dr^a **Paula de Carvalho Papa**, que excedeu a simples orientação e se tornou minha amiga de vários momentos, estando sempre a meu lado me apoiando, auxiliando e aconselhando da melhor maneira possível. Paula, a dedicação que você demonstra ao trabalho deve servir de exemplo a todos nós, porque só quem é absolutamente apaixonado pelo que faz, atua como você. Sua conduta é uma diretriz para a minha vida. Foram tempos muito agradáveis e produtivos que irão permanecer na minha memória para sempre. Paula, muito obrigada.....*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez, por ter permitido total utilização de seu laboratório e também do sistema de imagem, sem essa ajuda realmente seria muito difícil à realização deste trabalho.....

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, por ter doado material muito importante, que proporcionou a realização deste experimento, o que teria sido muito complicado se não fosse a sua ajuda.....

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, por dispor das instalações do Departamento de Anatomia.....

Ao Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, que me recebeu com todo carinho na primeira disciplina de Pós-graduação que cursei e que sempre atende a todos com muito carinho e atenção.....

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr, que me ajudou muito logo que iniciei meu mestrado.....

A Danila Barreiro Campos, minha grande amiga, que esteve presente em todos os momentos... Muito obrigada pela sua ajuda e seu apoio... Sem dúvida não tenho palavras para te agradecer.....

Ao Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Cadu, por um bom período nós trabalhamos juntos, mas depois, você voltou para o Rio Grande do Norte e deixou muita saudade para trás. Obrigada por dividir seu material comigo e por me ensinar tanta coisa. Sinto muito a sua falta.....

A Mônica Cristina Zandona Meleiro, minha amiga e companheira de almoços. Mônica agradeço pela confiança creditada e por todos os momentos que passamos juntas.....

Ao Fernando Garbelotti, que me ajudou muito e sempre esteve do meu lado.... Ao Ricardo Romão Guerra, que teve muita paciência para me ensinar a cortar no micrótomo... Ao Thiago Pinheiro Arrais Aloia, que por muitas vezes esteve ao meu lado e também me ajudou a cortar lâminas. A todos vocês muito obrigada.....

Ao Nécio Antonio Tonizza de Carvalho, que me ajudou com grande parte do material para o desenvolvimento deste trabalho..... Nécio, muito obrigada pela ajuda.....

Ao Maicon e a Jaqueline, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer a imensa ajuda que vocês dois me prestaram... E a Gracieva, que emprestou muitos livros da biblioteca da Anatomia....

A Liège Cristina da Silva Garcia, pelos vários bons momentos que passamos juntas em viagens, congressos, reações de imunohistoquímica. Li muito obrigada pelo companheirismo e pela sua amizade, não tenho como agradecer.....

A Selene Teruya, que me acompanhou em vários momentos, me emprestou seu livro e muitas outras coisas... Molhadinha, a sua ajuda foi mais que fundamental para a realização deste trabalho, obrigada por tudo... A Ieska Dalillo de Carvalho, por ter tido paciência em aprender algumas coisas comigo e também pela amizade, Ieska não sei como agradecer... A Vanessa Vemura, que também me acompanhou em vários momentos... Vanessa, muito obrigada.... A Mariana Nunes La Paz, uma grande amiga, que esteve presente em vários momentos e que sempre me ajudou... Mari, obrigada por tudo... A Vanessa Coutinho do Amaral, que esteve ao meu lado na etapa final da realização deste trabalho... Van, muito obrigada... Agradeço ao José Eduardo Barbosa Marques Jr pela amizade e por me ajudar com a estatística deste trabalho... Edu, obrigada pela ajuda, ela foi fundamental... Ao Diogo Nader Palermo, que acompanhou na coloração de lâminas e sempre me ajudou. Dioguito, obrigada pela amizade pela confiança e pelo companheirismo....

Agradeço a Flávia Thomas Verechia Pereira, seu apoio foi fundamental, você me ensinou muito do que eu sei hoje.... Obrigada pela sua ajuda, mesmo que muitas vezes por emails... Amiga!, Obrigada por tudo.... A Tatiana Carlesso dos Santos, que me acompanhou em diversos testes de imuno-histoquímica.... Ao Ronaldo, por ter permitido a utilização do laboratório em que trabalha.... Ao Vanderley Lima Guidi, que me ensinou como incluir o material e a cortar no ultramicrotomo. Vanderley, obrigada pela ajuda... Agradeço ao Fábio Alexandre Paarmann, pelo apoio e pela amizade e companheirismo... Agradeço a Tatiana Casimiro Mariani, Tati, obrigada pela confiança e por sua amizade. Afinal foram algumas reações de imunohistoquímica e inclusões de material que fizemos juntas... Agradeço a Ivana Carvalho pela amizade... Agradeço ao Emerson Fioretto, que me acompanhou nas primeiras fotos do meu material, ao Hildebrando, pela amizade e confiança. Ao Alexandre dos Santos pela companhia. Ao Isaac de Albuquerque por sua alegria, ao Flávio Curumim, pela companhia.....

E a todas as pessoas que participaram de alguma forma, muito obrigada.....

RESUMO

ARTONI, L. P. **FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação.** [Basic FGF and its receptors in relation to proliferative activity in the buffalo placenta during gestation]. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) é um dos fatores envolvidos na organogênese placentária. O fator participa da regulação dos processos de angiogênese, de crescimento e desenvolvimento placentário e de proliferação e diferenciação das células placentárias. A homeostase tecidual requer balanço entre proliferação e morte celular. A identificação de células em atividade proliferativa pode ser feita pela detecção do antígeno Ki-67 presente no núcleo das células em proliferação. Objetivou-se estudar a distribuição espaço-temporal do bFGF e dois de seus receptores, FGFR1 e FGFR2, na placenta bubalina correlacionando-a à proliferação celular. Foram utilizadas treze placentas de fêmeas da espécie bubalina em diferentes fases da gestação, divididas em quatro grupos. Grupo 1 (n=4), placentas de 3 meses; grupo 2 (n=4), 5 meses; grupo 3 (n=1), 8 meses e grupo 4 (n=4), 9,5 meses. Para a detecção da proteína do bFGF, FGFR1 e FGFR2 bem como do antígeno Ki-67 foram realizados testes de imuno-histoquímica. Para tal, bloqueou-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio PA a 1% em metanol e as reações inespecíficas com soro equino. A incubação com os anticorpos primários anti-Ki-67, anti-bFGF, anti-FGFR1 e anti-FGFR2 foi feita a 4°C por vinte e quatro horas e a incubação com o anticorpo secundário universal por vinte minutos em temperatura ambiente. Foi utilizado um complexo avidina-biotina para amplificar a reação e para revelação utilizou-se Nova Red®. A análise dos resultados foi feita em microscópio óptico em aumento de 400 vezes através do sistema de imagens

KS-400. Utilizou-se o programa Graph Prism 4 para análise estatística dos resultados. Foi detectada a expressão da proteína do bFGF e seus receptores no núcleo e citoplasma de células do estroma e epitélio maternos e fetais da placenta bubalina de maneira tempo-dependente ao longo da gestação. A atividade proliferativa apresentou perfil decrescente do início até o final da gestação. A correlação observada entre a expressão do bFGF e do Ki-67 nas células do epitélio materno e fetal e estroma materno foi positiva ($r = 0,282$, $r = 0,313$ e $r = 0,469$, respectivamente; $p < 0.05$); entre FGFR1 e Ki-67 a correlação foi mais elevada para as células do estroma e epitélio maternos e estroma fetal ($r = 0,739$, $r = 0,511$ e $r = 0,358$; $p < 0,0001$) e negativa para o epitélio fetal ($r = -0.211$); FGFR2 e Ki-67 a correlação foi negativa para as células epitélio materno ($r = -0,027$) e positiva para o epitélio e estroma fetal ($r = 0,384$ e $r = 0,268$; respectivamente; $p < 0.05$). Pode-se concluir a partir dos resultados obtidos que existe uma correlação positiva entre a expressão da proteína do bFGF de seus receptores 1 e 2 e o antígeno Ki-67. No entanto, essa correlação é dependente do tipo celular e da fase de gestação analisadas, e aponta para um possível envolvimento do bFGF e seu receptor 2 na proliferação do trofoblasto enquanto o receptor 1 modularia a ação de outro agente proliferativo no epitélio materno e estromas materno e fetal.

Palavras-chave: Fatores de crescimento. Imuno-histoquímica. Proliferação celular. Placenta. Búfalos.

ABSTRACT

ARTONI, L. P. **Basic FGF and its receptors in relation to proliferative activity in the buffalo placenta during gestation.** [FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação]. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) is involved in the placental organogenesis as a potent angiogenic molecule and is related to the growing and development of the placenta and proliferation of placental cells. Tissue homeostasis requires a balance between cell proliferation and cell death. The identification of proliferating cells can be made through the detection of Ki-67 nuclear antigen, present in these cells. The aim of this study was to evaluate the space-temporal expression of bFGF and two of its receptors, FGFR1 and FGFR2, in buffalo placenta in correlation to proliferative activity. In this study 13 buffalo placentas in different gestational phases were collected and divided into four groups. Group 1 (n=4), three moth-old placentas; group 2 (n=4), five month-old; group 3 (n=1), eight month-old and group 4 (n=4), 9.5 month-old. For the localization of bFGF, FGFR1, FGFR2 proteins and Ki-67 antigen, immunohistochemical assays were carried out. For that purpose, endogenous peroxidase activity was blocked with 1% Hydrogen Peroxide PA in methanol and non-specific binding with equine serum (1:10). Incubations with primary antibodies anti-Ki-67, anti-bFGF, anti-FGFR1 and anti-FGFR2 were made for 24 hours at 4°C. Incubation with universal secondary antibody (1:200) was made for 20 minutes in moist chamber at room temperature. Avidin/biotinylated horseradish ABC Elite Kit was used to amplify and Nova Red[®] to develop the immunostaining. Slides were observed under a light microscope at 400 times magnification and photographed with KS-400 image program. Graph Prism 4.0 program was used for statistical analysis.

Expression of the bFGF and its receptors proteins was detected in the nucleus and cytoplasm of buffalo placental cells during gestation. Placental proliferative activity was evaluated through the expression of Ki-67 antigen. The correlation observed between bFGF and Ki-67 expression in the maternal and fetal epithelium and maternal stroma cells was positive ($r = 0,282$, $r = 0,313$ e $r = 0,469$, respectively; $p < 0.05$). Between FGFR1 and Ki-67 the correlation was higher for maternal epithelial and stroma and fetal stroma cells ($r = 0,739$, $r = 0,511$ e $r = 0,358$, respectively; $p < 0,0001$) and negative for fetal epithelium ($r = -0.211$). FGFR2 and Ki-67 correlation observed was negative for maternal epithelium cells ($r = -0,027$) and positive for fetal epithelium and stroma cells ($r = 0,384$ e $r = 0,268$; respectively; $p < 0.05$). We conclude that bFGF and its receptors 1 and 2 are positively correlated to the expression of the Ki-67 antigen, depending on cell type and gestational period. The results suggest that bFGF and its receptor 2 may be involved in the modulation of trophoblast proliferation, whereas FGFR1 may modulate proliferation in the maternal epithelium and fetal and maternal stroma, probably through the binding to another growth factor (s).

Key Words: Growth Factors. Immunohistochemistry. Cellular proliferation. Placenta. Buffalo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema das membranas fetais, sem distinção de espécie. Córion (1), cavidade amniótica (2), cavidade do saco vitelino (3), cavidade alantóica (4), exocoel (5), saco vitelino avascular da placenta (6), placenta coriovitelínica (7), porção externa do saco vitelino (8), mesênquima avascular (9), alantocorion (10) (Fonte: Björkman, 1976)..... 30
- Figura 2 - Esquema de placenta do tipo cotiledonária observada em ruminantes, notar que a placenta apresenta pontos de interdigitações entre as partes maternas e fetais, aqui representadas em preto (fetal) e pontilhado (materna) (Fonte: Leiser e Kaufmann, 1994) 32
- Figura 3 - Esquema demonstrando interdigitação materno-fetal do tipo vilosa observado nos ruminantes (Fonte: Leiser e Kaufmann, 1994)..... 33
- Figura 4 - Esquema das camadas de tecidos materno-fetais que formam a barreira hemal, segundo a classificação de Grosser. Em ruminantes a placenta é classificada como sinepteliocorial. Componentes maternos (M), componentes fetais (F) (Fonte: Leiser e Kaufmann, 1994)..... 34
- Figura 5 - Esquema do arranjo dos fluxos materno e fetal na placenta de ruminantes, sistemas A: contra-corrente e B: corrente cruzada (Adaptado de LEISER, KAUFMANN, 1994) 35
- Figura 6 - Fotomicrografias da localização da proteína do bFGF na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal bFM-2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o fator de crescimento em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm..... 60
- Figura 7 - Fotomicrografias da localização da proteína do FGFR1 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal 19B2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o receptor do fator de crescimento em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm 63

- Figura 8 - Fotomicrografias da localização da proteína do FGFR2 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti FGFR2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o receptor do fator de crescimento em células do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm..... 66
- Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína do Ki-67 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal MB67. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o antígeno nuclear em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm..... 68
- Figura 10 Fotomicrografias de placenta bubalina aos 150 dias de gestação. Controle negativo das reações de imuno-histoquímica para Ki-67 (A), bFGF (B), FGFR1 (C) e FGFR2 (D): adição de PBS ao invés do respectivo anticorpo primário. Barra: 100µm..... 69
- Figura 11 Correlação (r) da expressão do bFGF (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = 0,282$); B: expressão em células do epitélio fetal ($r = 0,313$); C: expressão em células do estroma materno ($r = -0,203$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,469$)..... 72
- Figura 12 Correlação (r) da expressão do FGFR1 (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = 0,739$); B: expressão em células do estroma materno ($r = 0,511$); C: expressão em células do epitélio fetal ($r = -0,211$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,358$)..... 74
- Figura 13 Correlação (r) da expressão do FGFR2 (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = -0,027$); B: expressão em células do estroma materno ($r = 0,165$); C: expressão em células do epitélio fetal ($r = 0,384$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,268$)..... 76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos anticorpos primários e secundário utilizados nos testes de imuno-histoquímica.	53
Quadro 2 - Determinação da idade gestacional através da medida crown rump	56

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	fator de crescimento fibroblástico ácido
APES	3-aminopropiltietoxi-silano
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
BrdU	Bromodeoxyuridine
DNA	ácido desoxiribonucleico
ECM	matriz extracelular
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGFR	receptor para o fator de crescimento fibroblástico
FGFRs	receptores para o fator de crescimento fibroblástico
HMW	high molecular weight
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
HSPGs	heparan sulfate proteoglycans
IGF	fator de Crescimento Semelhante à Insulina
LMW	low molecular weight
PBS	solução tampão fosfato
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PIGF	fator de crescimento placentário
RNA	ácido ribonucléico
RNAs	ácidos ribonucléicos
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
TNF	fator de necrose tumoral
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 PLACENTA	28
3.2 DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS FETAIS E PLACENTAÇÃO	29
3.3 CLASSIFICAÇÃO PLACENTÁRIA DOS RUMINANTES	32
3.4 PLACENTA NA ESPÉCIE BUBALINA	36
3.5 FUNÇÕES DOS FATORES DE CRESCIMENTO NA PLACENTA	36
3.6 FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO	38
3.6.1 Receptores de alta afinidade para o bFGF	40
3.7 DINÂMICA CELULAR	43
3.7.1 Ciclo celular	43
3.7.1.1 Antígeno Ki-67	47
4 MATERIAL E MÉTODO	48
4.1 DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL	49
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL	50
4.2.1 Preparo do material para inclusão em Histosec®	51
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA Ki-67, bFGF E SEUS RECEPTORES	51
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	55
5.1 DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL	56
5.2 IMUNOLocalização DO bFGF E SEUS RECEPTORES	57
5.2.1 Imunolocalização do bFGF	58
5.2.1.1 Reação nuclear do bFGF	58
5.2.1.2 Reação citoplasmática do bFGF	59
5.2.2 Imunolocalização do FGFR1	61
5.2.2.1 Reação nuclear do FGFR1	61
5.2.2.2 Reação citoplasmática do FGFR1	62
5.2.3 Imunolocalização do FGFR2	64
5.2.3.1 Reação nuclear do FGFR2	64
5.2.3.2 Reação citoplasmática do FGFR2	65

5.3 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO Ki-67	67
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO bFGF, FGFR1 E FGFR2 E DO ANTÍGENO Ki-67	70
6 DISCUSSAO	77
6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA.....	78
6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	79
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICES	113

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O búfalo é um animal longevo que apresenta ótima conversibilidade de pastagens de baixo valor nutritivo em carne de alto teor protéico e baixo nível de colesterol. Produz leite de alto valor nutritivo, utilizado principalmente para a fabricação de queijo mussarela. Este animal pode se adaptar muito bem em terras alagadas da Amazônia, que são ricas em nutrientes orgânicos e minerais (OLIVEIRA, 2004).

Existe uma crescente preocupação dos criadores de búfalos com a melhoria da produtividade dos rebanhos, envolvendo aspectos sanitários, genéticos, qualidade da carne e inclusive estratégias de comercialização (REGGETI, 2004). Caracterizar melhor o processo gestacional destes animais pode contribuir bastante para o aumento da produtividade da espécie.

O bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) é um fator de crescimento envolvido na regulação da proliferação de diversos tipos celulares (KASHIWAKURA; TAKAHASHI, 2003; ROBERTS; ELLIS, 1999; LANG et al., 2001). O fator é ainda importante modulador da diferenciação (ROGELJ et al., 1989) e migração (BIKFALVI et al., 1995) celular, além de ser um potente indutor da angiogênese sob condições normais *in vitro* e *in vivo* (INGBER; FOLKMAN, 1989; LAZAROUS et al., 1995) e patológicas (HORI et al., 1991; YOSHIJI et al., 2002).

Diversos estudos indicam a participação do bFGF durante a organogênese placentária (SRIVASTAVA et al., 1998; BURLEIGH et al., 2004; MÜHLHAUSER et al., 1996). O bFGF regula os processos de angiogênese, de crescimento e desenvolvimento placentário (ZHENG et al., 1997) e de proliferação e diferenciação das células placentárias (CATTINI et al., 1991; FERRIANI et al., 1994).

Em todos os tipos celulares os processos de diferenciação e proliferação celular acontecem separadamente. A dinâmica celular envolve a duração do ciclo celular e o índice de formação de novas células filhas, aquelas originadas após o processo mitótico. Geralmente os fatores de crescimento atuam na fase G₁ da mitose. A liberação dos fatores de crescimento por uma célula influencia a proliferação de outra por meio de estimulação parácrina (IATROPOULOS, WILLIAMS, 1996).

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, presente em todas as formas ativas do ciclo celular e ausente na fase de quiescência (GERDES et al., 1983; GERDES et al., 1984). Sua expressão reflete a atividade proliferativa e foi utilizada neste trabalho como um indicador da função proliferativa do bFGF. Uma vez determinada a ação proliferativa trófica deste fator na placenta, seria possível utilizá-lo direcionadamente para otimizar o processo reprodutivo.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Este trabalho baseou-se na hipótese de que o bFGF estimula a proliferação celular na placenta bubalina ao longo da gestação.

Para testar esta hipótese, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliação da expressão das proteínas do bFGF e seus principais receptores, FGFR1 e FGFR2, ao longo da gestação em placenta bubalina;
- 2 Avaliação da expressão do antígeno Ki-67 ao longo da gestação;
- 3 Correlacionar a expressão das proteínas do bFGF e seus receptores com a expressão do Ki-67, um marcador de proliferação celular.

3 Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo De Witt (1958) o antigo testamento traz a concepção dos Egípcios, na qual a placenta seria um recipiente que continha a alma do rei. A primeira descrição da função da placenta foi feita por Diógenes de Apollonia em 480 a.C. na era dos filósofos Pré-Socráticos, onde ele definia placenta como um órgão responsável pela nutrição fetal. Empédocles e Demócrito em aproximadamente 460 a.C. sustentavam a teoria de que o feto se nutria e respirava através de nutrientes provenientes de “papilas uterinas” ou cotilédones que seriam formados por células localizadas abaixo do revestimento uterino durante a gestação.

Livros de Hipócrates versam sobre concepção, nidação e nutrição. Aristóteles em 384 a 322 a.C., na era Socrática, afirmava que o embrião encontrava-se recoberto por membranas, as quais foram denominadas córion. Na época do Renascimento, Leonardo da Vinci (1452 – 1510) descreveu a placenta discoidal humana como cotiledonária, conectada, mas não unida ao útero através de cotilédones (DE WITT, 1958). Foi Columbus (1516-1559) quem introduziu o termo placenta em 1559 (BOYD; HAMILTON, 1970).

Conjecturas sobre a placenta bem como as membranas fetais foram feitas no tempo de Fallopius em 1523. Arantius (1530 – 1589) utilizou o termo *hepar uterinum*, propondo que a placenta trabalharia para o feto nos processos de hematopoese e purificação do sangue. Spigelius (1578 – 1625), aluno de Fabrícus, foi o primeiro a determinar o fluxo das artérias umbilicais. Needham (1631 – 1691) descreveu a

placenta e as membranas fetais. John Mayow (1627 – 1691) inferiu que o útero seria um órgão adaptado para separar partículas aéreas provenientes do sangue, sugerindo que a placenta fosse um órgão respiratório, assim alterando o termo introduzido por Arantius para *pulmo uterinum* ao invés de *hepar uterinum* (DE WITT, 1958).

Ainda segundo De Witt (1958), no século XIX Bischoff acreditava que o sincíotrofoblasto (camada de tecido placentário diretamente em contato com o sangue materno) tinha origem na mucosa uterina. Bischoff fez observações a respeito das barreiras placentárias e Minot, juntamente com Grosser, contribuíram com descrições sobre a estrutura da placenta. Grosser fez uma introdução ao termo placentação: “A placenta no seu sentido restrito presume a existência de um córion fetal que se localiza diretamente sobre a mucosa materna. Placentação é uma íntima conexão (por justaposição) que é vascularizada tanto pelo alantóide quanto pelo saco vitelino para uma mediação entre a respiração e nutrição do embrião e para a eliminação de seus produtos de catabolismo”.

3.1 PLACENTA

O termo mais compreensivo sobre placenta foi usado por Mossman (1937), descrevendo-a como uma aposição entre um tecido parenteral (materno) com um tecido fetal com finalidades de trocas fisiológicas (WODDING; FLINT, 1994). A placenta é um órgão único, autônomo e transiente, o que assegura trocas materno-

fetais, além de impedir o reconhecimento dos antígenos de origem paterna pela mãe. Os hormônios de origem placentária são necessários para o estabelecimento e manutenção da gestação, bem como adaptação do organismo materno ao estado gestacional, crescimento fetal e desenvolvimento dos mecanismos necessários para o parto (CONLEY; MASON, 1990; GILL; WEGMAN, 1987; LALA et al., 1983; MALASSINE; FRENDON; EVAIN-BRION, 2003; WOODING; FLINT, 1994).

A placenta seria um órgão através do qual nutrientes chegam e detritos são eliminados. Durante a última metade do processo gestacional um aumento da atividade placentária ainda é observado, o que está intimamente relacionado com aumento no fluxo sanguíneo e número de vasos neste órgão, provavelmente regulados pela produção de fatores angiogênicos pela própria placenta (REYNOLDS; REDMER, 1995).

3.2 DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS FETAIS E PLACENTAÇÃO

A fusão do gameta masculino e o feminino resulta na formação do zigoto. Depois de repetidas divisões, ocorre a formação do blastocisto, um embrião. Durante a gestação processos de trocas fisiológicas, como a respiração e nutrição requerem especial atenção, que é proporcionada pela íntima relação entre as membranas fetais e o endométrio, processo este conhecido como implantação. Este órgão recém formado, a placenta, é então composta de partes maternas e fetais. O feto e a

porção fetal da placenta caracterizam o conceito. A formação e a adesão das membranas fetais ao endométrio, recebe o nome de placentação (BJÖRKMAN, 1976).

Segundo Björkman (1976) a parede do blastocisto consiste em um epitélio unilaminar denominado trofoblasto, que se desenvolve antes que a camada celular interna se diferencie em camada germinativa que posteriormente recebe uma camada de mesoderma, dando origem ao córion. Uma vesícula ectodérmica, o amnion, também se alinha ao mesoderma que envolve o feto e o preenche de líquido. Uma vesícula mais interna, o saco vitelino e o alantóide participam da formação da placenta (Figura 1). A cavidade circundada pelo córion, que contém o embrião, vesícula amniótica, saco vitelino e o alantóide é chamada de exocoel (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Fonte: BJÖRKMAN, 1976.

Figura 1 - Esquema das membranas fetais, sem distinção de espécie. Córion (1), cavidade amniótica (2), cavidade do saco vitelino (3), cavidade alantóica (4), exocoel (5), saco vitelino avascular da placenta (6), placenta coriovitelínica (7), porção externa do saco vitelino (8), mesênquima avascular (9), alantocorion (10)

O córion consiste de uma camada de células epiteliais derivadas da parede externa do blastocisto, o trofoblasto, que durante o curso da implantação recebe uma camada de células derivadas da porção interna do mesênquima, que tem origem fetal. Pouco tempo depois o mesênquima desenvolve sua própria rede de capilares. Na maioria das espécies o epitélio coriônico, ou o trofoblasto, que consiste da porção mais externa parte fetal da placenta, representa a principal barreira entre os organismos maternos e fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O amnion, outra camada de células epiteliais, é formado a partir de dobras no ectoderma embrionário. Semelhante ao córion, o amnion também recebe uma camada de suporte mesenquimal, mas nunca desenvolve sua própria rede vascular. O amnion consiste do segundo folheto embrionário e pode atuar como uma barreira materno-fetal adicional (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O saco vitelino se desenvolve de partes anexas ao intestino delgado e é constituído das camadas de epitélio ectodérmico acompanhadas pelo mesênquima fetal vascularizado, mas não participa da troca materno-fetal. O alantóide corresponde à bexiga urinária extra-embrionária e se desenvolve a partir do intestino grosso embrionário: é caracterizado como um saco extra-embrionário, que é envolvido por mesênquima extremamente vascularizado (BJÖRKMAN, 1976).

3.3 CLASSIFICAÇÃO PLACENTÁRIA DOS RUMINANTES

Segundo Leiser e Kaufmann (1994) a placenta dos mamíferos possui áreas de contato entre as partes materna e fetal através da formação de interdigitações entre os dois tecidos de forma mais ou menos intensa. Na maioria dos mamíferos as interdigitações encontram-se concentradas em pequenas áreas. A placenta do tipo cotiledonária (Figura 2), encontrada nos ruminantes, é caracterizada pela presença de regiões específicas de trocas (placentoma), as quais são separados por áreas intercotiledonárias de córion liso. Os placentomas são compostos pela carúncula materna e pelo cotilédone fetal, são responsáveis por trocas respiratórias, de nutrientes e dejetos. O crescimento e desenvolvimento normal dos placentomas são essenciais para o desenvolvimento e crescimento fetal (LAVEN; PETERS, 2001).

Fonte: LEISER, KAUFMANN, 1994

Figura 2 - Esquema de placenta do tipo cotiledonária observada em ruminantes, notar que a placenta apresenta pontos de interdigitações entre as partes maternas e fetais, aqui representadas em preto (fetal) e pontilhado (materna)

Nos ruminantes, nos eqüinos e em primatas mais desenvolvidos a classificação da placenta é vilosa quanto ao tipo de vilos (Figura 3): o córion forma vilos semelhantes a árvores que penetram no tecido materno correspondente (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Fonte: LEISER, KAUFMANN, 1994

Figura 3 - Esquema demonstrando interdigitação materno-fetal do tipo vilosa observado nos ruminantes

Quanto às camadas de membranas interhemais, ou seja, número de camadas de tecidos que separam as partes maternas das fetais, a placenta dos ruminantes pode ser classificada como sinepteliocorial (Figura 4), que é semelhante à epiteliocorial, onde o córion fetal recoberto pelo trofoblasto está aderido a mucosa uterina, de maneira que seis barreiras teciduais podem ser observadas: endotélio materno, tecido conjuntivo, epitélio materno, epitélio fetal (trofoblasto), tecido conjuntivo e endotélio fetal separam as circulações materna e fetal; entretanto, nos ruminantes algumas células trofoblásticas, denominadas binucleadas ou trofoblásticas gigantes se fundem ao epitélio uterino, formando células trinucleadas (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Fonte: LEISER, KAUFMANN, 1994.

Figura 4 - Esquema das camadas de tecidos materno-fetais que formam a barreira hemal, segundo a classificação de Grosser. Em ruminantes a placenta é classificada como sinepteliocorial. Componentes maternos (M), componentes fetais (F)

A placenta dos ruminantes foi classificada como sindesmocorial, (Borlands Dicionário Médico, sindesmo: relacionado ao tecido conjuntivo) pois o epitélio uterino seria substituído por trofoectoderma fetal diretamente em contato com o tecido conjuntivo materno (AMOROSO, 1952; STEVEN, 1975). Entretanto, observou-se que o epitélio uterino persiste (algumas vezes de maneira sincicial) e a placenta dos ruminantes foi reclassificada para placenta do tipo epiteliocorial (LUDWIG, 1962; STEVEN, 1975).

Outras evidências demonstraram que a placenta dos ruminantes possui uma camada de células binucleadas coriônicas fetais, ou células trofoblásticas gigantes (CTG) ou ainda células binucleadas, as quais migram durante a gestação através das junções coriônicas e se fundem às células do epitélio uterino, conferindo à placenta o nome sinepteliocorial (WOODING, 1992). Segundo Dantzer (1999), a

placenta bovina é um sub-tipo da placenta epiteliochorial devido às formações celulares que ocorrem por fusão das células binucleadas com as células epiteliais e recebe então a denominação de sinepteliocorial.

A quantidade de tecido fetal ancorado ao endométrio determina a quantidade de tecido que será perdido no momento do parto (BJÖRKMAN, 1976). Quanto ao tipo de separação placentária, a placenta de ruminantes pode ser classificada como não decídua, com separação das áreas de contato materno-fetais, proporcionando grandes superfícies de tecidos maternos e fetais intactos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Quanto à relação do fluxo sanguíneo materno-fetal (ou arranjo geométrico entre os capilares maternos e fetais), a placenta dos ruminantes é classificada como do tipo contra-corrente no início da gestação (Figura 5 A) e depois se torna contracorrente com fluxo multiviloso (Figura 5 B), na qual os capilares maternos e fetais encontram-se arranjados em paralelo, mas com o fluxo sanguíneo em direções opostas, consistindo a maneira mais eficiente de arranjo vascular para difusão passiva (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Figura 5 - Esquema do arranjo dos fluxos materno e fetal na placenta de ruminantes, sistemas A: contra-corrente e B: corrente cruzada (Adaptado de LEISER, KAUFMANN, 1994)

3.4 PLACENTA NA ESPÉCIE BUBALINA

A descrição da placenta de búfalos feita por Enriquez-Yap (1974) é semelhante à descrita para bovinos: o placentoma também apresenta forma de cogumelo com uma superfície livre convexa e um pequeno pedúnculo. A membrana ou barreira placentária é composta por 6 camadas: o lado materno é composto pela camada endotelial dos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo endometrial e camada do epitélio endometrial da cripta e o lado fetal pela camada epitelial dos vilos coriônicos, centro do tecido conjuntivo dos vilos coriônicos e endotélio dos vasos sanguíneos.

O formato dos cotilédones na placenta de búfalos também é variável podendo ser observadas as formas: circular, elíptica, quadrangular, ovóide ou reniforme. Também ocorre fusão entre cotilédones vizinhos em diversos graus. O número máximo de cotilédones encontrado foi de 134 e o mínimo de 64, com uma média de 92 cotilédones por placenta, média maior do que a observada em placentas de fêmeas bovinas (ENRIQUEZ-YAP, 1974).

3.5 FUNÇÕES DOS FATORES DE CRESCIMENTO NA PLACENTA

Os fatores de crescimento desempenham importante papel no desenvolvimento placentário. Um evento de extrema importância que acompanha o processo

gestacional denominado de angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (FOLKMAN; SHING, 1992; GERWINS; SKÖLDENBERG, CLAEISSON-WELSH 2000; ZYGMUNT et al., 2003).

Em geral, o processo angiogênico é estimulado por fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) , Fator de Crescimento Placentário (PIGF), fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) entre outros (FOLKMAN, 1995) produzidos pelos próprios tecidos placentários, os quais estimulam a angiogênese através da indução de proliferação celular (CATTINI et al., 1991; SHAMS; AHMED, 1994). Em ovelhas demonstrou-se que durante a gestação as glândulas endometriais sofrem hiperplasia, seguidas de hipertrofia e passam a sintetizar, secretar e transportar uma variedade de enzimas, fatores de crescimento, citocinas, hormônios, proteínas entre outras substâncias (GRAY et al., 2001; ROBERTS; BAZER, 1988).

O Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF) regula a angiogênese, crescimento e desenvolvimento placentário (ZHENG et al., 1997) além de estimular a proliferação e diferenciação das células da placenta (CATTINI et al., 1991; FERRIANI et al., 1994).

3.6 FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO

O bFGF (Fator de Crescimento Fibroblástico básico) é um membro da família dos FGFs (Fatores de Crescimento Fibroblástico) que até o momento é composta por 24 isoformas (FISCHER; DRAPER; NEUMANN, 2003). O bFGF foi inicialmente identificado a partir de produtos da pituitária bovina através da atividade mitogênica da linhagem celular Balb/c3T3 (GOSPODAROWISCZ, 1975).

Existem 5 isoformas do bFGF humano, as quais se originam a partir de derivação alternativa (FLORKIEWICZ; SOMMER, 1989; PRATS et al., 1989). Dentre as cinco isoformas do bFGF uma possui baixo peso molecular (18 kDa - LMW) e as outras quatro alto peso molecular (22; 22,5; 24 e 34 kDa - HMW). A isoforma de baixo peso molecular é citoplasmática e sua ação acontece de maneira autócrina, as isoformas de alto peso molecular são nucleares e parecem atuar de maneira intrácrina (ARESE et al., 1999; YU et al., 1993).

Dentre as funções biológicas do bFGF podemos citar a estimulação da migração celular, da proliferação, do desenvolvimento embrionário (BASILICO; MOSCATELLI, 1992; BURGESS; KUHN et al., 1997; GRITII et al., 1996; MACIAG, 1989; MASON, 1994; NUGENT; IOZZO, 2000, OKADA-BAN et al.; 2000; RIFKIN; MOSCATELLI, 1989), do crescimento de células musculares lisas (SCHWARTZ; LIAW, 1993) e cicatrização de tecidos (BASILICO; MOSCATELLI, 1992; SCHWARTZ; LIAW, 1993). Pode também estimular a hematopoiese (BIKFALVI; HAN, 1994; ALLOUCHE; BIFFALVI, 1995), favorecer a diferenciação do sistema nervoso (BAIRD, 1994;

LOGAN; FRAUTSCHY; BAIRD, 1991; UNSICKER et al., 1992;), do olho (McAVOY et al., 1991) e do esqueleto (FALLON et al., 1994; RILEY et al., 1993).

Uma vez liberado pela célula, este fator de crescimento se concentra na matriz extracelular (ECM) ligado ou não as proteoglicanas com sulfato de heparina (HSPGs) (DOWD; COONEY; NUGENT, 1999). Essas proteoglicanas podem aumentar ou diminuir a atividade do bFGF (NUGENT; IOZZO, 2000) aumentando sua afinidade pelos seus receptores (PANTOLIANO et al., 1994; ROGHANI et al., 1994).

A translocação do bFGF ao núcleo parece estar relacionada com a estimulação da proliferação (WIEDLOCHA et al., 1994). O mecanismo de ação para que ocorra a translocação do FGF ainda não está completamente elucidado, mas os receptores de alta afinidade do FGF parecem estar envolvidos neste processo (MAHER, 1996). A translocação nuclear deste fator de crescimento é dependente do ciclo celular e ocorre nas fases G1 e S da interfase. Isso resulta na diminuição da degradação do bFGF e aumento da atividade mitogênica (BIKFALVI et al., 1997; SPERINDE; NUGENT, 1998).

A localização nuclear, além de estar associada com a atividade proliferativa ou estado de ativação celular (YU et al., 1993) pode também estar associada à redistribuição do bFGF localizado no citoplasma para o núcleo ou extração seletiva do citoplasma após permeabilização, mas a isoforma de baixo peso molecular do bFGF é dificilmente observada em frações nucleares (RENKO et al., 1990).

O rápido transporte do bFGF exógeno para o núcleo de células aórticas endoteliais em proliferação no final da fase G1 (BALDIN et al., 1990) e a estimulação da atividade polimerase do RNA pelo bFGF em núcleos isolados, juntamente com a localização nucleolar deste fator de crescimento, sugere que o bFGF estimule diretamente a biosíntese de genes ribossômicos (BOUCHE et al., 1987).

3.6.1 Receptores de alta afinidade para o bFGF

O bFGF se liga a receptores de membrana de alta e baixa afinidade (ROGHANI; MOSCATELLI, 1992; MORONO et al., 1993; RUSNATI; URBINATI; PRESTA, 1993). A ligação do bFGF com seus receptores de alta afinidade (receptores com atividade tirosina quinase) resulta na indução da autofosforilação do receptor e da fosforilação dos substratos da tirosina (FANTL et al., 1993), os receptores de baixa afinidade consistem em proteoglicanas com sulfato de heparina (HSPG), que favorecem a ligação dos dímeros de FGF aos receptores tirosina quinase (MOSCATELLI, 1989; BAIRD, 1994).

Fatores de crescimento como o bFGF e o VEGF, quando se ligam a receptores de alta especificidade tirosina-quinase, induzem a ativação da atividade intrínseca enzimática destes receptores (KAVANAUGH; WILLIAMS, 1996). Essa atividade permite a fosforilação dos receptores de tirosina, bem como dos substratos das quinases e podem estimular atividades celulares como proliferação, motilidade e diferenciação (PAWSON, 1991).

A família dos receptores de FGF (FGFR) é composta até o momento de cinco genes identificados e uma grande variedade de subtipos formados a partir de derivação alternativa (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999). FGFR1 ou flg (LEE et al., 1989; MANSUKHANI et al., 1990; REID; WILKS; BERNARD, 1989); FGFR2 (DIONNE et al., 1990; HOUSSAINT et al., 1990; KORNBLUTH; PAULSON; HANAFUSA, 1988; PASQUALE; 1990; RAZ et al., 1991), FGFR3 (KEEGAN et al., 1991), FGFR4 (PATERNEN et al., 1991) e FGFR5 (SLEEMAN et al., 2001). Os receptores FGFR1 e FGFR2 são considerados os principais receptores da família de FGFR (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 2000).

Os FGFR possuem um domínio extracelular, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático com atividade tirosina quinase. A porção extracelular compreende três domínios semelhantes a imunoglobina, D1, D2 e D3 (ou I, II e III) (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999).

A especificidade de ligação do FGFR1, FGFR2 e FGFR3 está relacionada ao terminal C do domínio extracelular III (D3). O FGFR4 apresentam apenas o domínio extracelular III e o bFGF parece não se ligar a esse receptor com muita afinidade (PATERNEN et al., 1991); já os FGFR1 ao FGFR3 apresentam derivações alternativas no exon III, (IIIa, IIIb e IIIc). A expressão do domínio IIIa está relacionada a forma secretora, já os domínios IIIb e IIIc se localizam na membrana celular (WERNER et al., 1992). O bFGF pode se ligar aos cinco receptores, mas possui afinidade maior pelos receptores que possuem o domínio IIIc (COLEMAN, 2003). O quinto receptor de FGF difere dos outros quatro, este receptor é composto por uma

proteína de membrana e um domínio extracelular composto por 16 cisteínas (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999).

Segundo estudos feitos por Stauber; Digabriele; Hendrickson (1999) o FGF se liga primeiramente a receptores de superfície celular, os quais estão relacionados a dímeros de sinalização presentes em proteoglicanas com heparina. Diversos pesquisadores atribuem as HSPGs o papel de principais moléculas de domínio extracelular não-sinalizadoras envolvidas na ativação do FGF (KLAGSBRUN; BAIRD, 1991; OLWIN; RAPRAEGER, 1992; ORNITZ; LEDER, 1992; ORNITZ et al., 1992; RAPRAEGER; KRUFKA; OLWIN, 1991; RAPRAEGER et al., 1994; YAYON et al., 1991).

Pode ocorrer alteração na intensidade da expressão dos FGFRs em células em proliferação, diferenciação ou transformação maligna para a formação de tumores. Células em desenvolvimento geralmente apresentam maior expressão dos FGFRs que células no período de quiescência. Durante a fase de diferenciação celular pode acontecer o aumento ou a diminuição da expressão dos FGFRs de acordo com o tipo celular (BIKFALVI et al., 1997).

Alta expressão do FGFR1 pode ser observada na pele, córnea, pulmão, placenta, assim como para o FGFR2 encontrado na próstata e estômago (HUGHES, 1997). Segundo Pfarrer et al. (2003) ambos os receptores (FGFR1 e FGFR2) são expressos na placenta bovina. O FGFR1 é expresso também por células endoteliais (BASTAKI et al., 1997; KANDA et al., 1996; PETERS et al., 1992). A ativação deste receptor leva a autofosforilação de tirosinas (KLINT; CLAEISSON-WELSH, 1999;

MOHAMMADI et al., 1996), que favorece ligação estável com diferentes moléculas de tradução de sinais (KLINT; CLAEISSON-WELSH, 1999).

3.7 DINÂMICA CELULAR

A homeostase tecidual requer balanço entre proliferação e morte celular (KING; CIDLOWSKI, 1998; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Quando células somáticas proliferam, um controle do ciclo mitótico se dá a partir de uma rede de sinais positivos e negativos (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993). Os processos de mitose e apoptose apresentam aspectos morfológicos semelhantes: as células perdem aderência e se tornam arredondadas, contraem-se e condensam a cromatina. Mesmo com inúmeras similaridades observadas entre estes dois processos, diferenças existem. No processo mitótico, o DNA é separado e o núcleo dividido em duas partes distintas, mas iguais. Este processo termina com citocinese e produção de uma nova célula filha (KING; CIDLOWSKI, 1998).

3.7.1 Ciclo celular

A cinética celular envolve a duração do ciclo celular, o índice de formação e o índice de crescimento de novas células. O ciclo celular compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até a sua própria divisão em duas células filhas. Este ciclo é dividido em duas etapas: a interfase (fase compreendida entre duas divisões sucessivas) na qual a célula cresce e se prepara para uma nova

divisão e a fase de cariocinese ou mitose propriamente dita, divisão do núcleo, originando duas células filhas, seguida pela citocinese, ou seja, divisão do citoplasma (ALBERTS, 1997; DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1986; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

A intérfase divide-se em três etapas: a fase G1 caracteriza-se pelo recomeço da síntese de RNA e proteínas, de maneira que neste período a célula cresce rapidamente. Os fatores de crescimento representam um dos fatores extracelulares que controlam a saída ou não das células do ciclo celular. A célula retirada do ciclo, fica em estado quiescente, denominado G0. O período seguinte, ou S, é caracterizado pelo início da síntese do DNA e replicação. Por último, o período G2 se caracteriza pela total replicação do DNA e acúmulo de outras proteínas (que se associam aos cromossomos durante a sua condensação na mitose) e fator promotor de maturação, que é considerado o regulador geral da transição de G2 para M, mitose propriamente dita (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1986; JORDÃO; ANDRADE, 2000).

A mitose divide-se em quatro fases: a prófase (*pro*-primeira) é caracterizada pela condensação das fibras de cromatina até a formação dos cromossomos acompanhados pelas cromátides, que carregam o material genético duplicado. Como consequência da condensação progressiva, a cromatina torna-se inativa, deixa de transcrever RNAs, os nucléolos se desorganizam, e no citoplasma os centríolos migram para pólos opostos da célula. À medida que se afastam, formam-se os feixes de microtúbulos entre eles, que irão constituir as fibras do fuso. Com a ruptura do envoltório nuclear, os microtúbulos do fuso têm acesso aos

cromossomos, que neste momento apresentam cinetócoros maduros, de maneira que alguns microtúbulos se prendem a estes e recebem o nome microtúbulos cinetocóricos, responsáveis por direcionar os cromossomos para a região equatorial da célula. A fase que compreende a ruptura do envoltório até a formação dos microtúbulos cinetocóricos, pode denominada prometáfase (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1986; JORDÃO; ANDRADE, 2000).

Na metáfase os cromossomos atingem a condensação máxima e o alinhamento dos cromossomos na região equatorial da célula, formando a placa metafásica. Na anáfase ocorre a ruptura do equilíbrio metafásico com a separação dos centrômeros e a migração das cromátides para os pólos opostos, recebendo o nome de cromossomos filhos. Na telófase os cromossomos filhos alcançam os respectivos pólos, com total desaparecimento dos microtúbulos cinetocóricos, ocorrendo então à reconstituição dos núcleos e a divisão citoplasmática, com a formação das células filhas. A citocinese faz parte da telófase, mas pode ter seu início na anáfase (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1986; JORDÃO; ANDRADE, 2000).

Todos os fatores de crescimento exercem sua influência na fase G1 (IATROPOULOS; WILLIAMS, 1996). Este período compreende a fase de reinício da síntese de RNA e proteínas até alcançar quantidade suficiente para iniciar a fase S, fase em que ocorre o início da síntese do DNA, ou seja, replicação. Através de sinais extracelulares, os fatores de crescimento atuam antes mesmo da fase G1, no período de quiescência das células, estimulando a reentrada de alguns tipos celulares no ciclo celular, retornando ao período G1 (ALBERTS, 1997; DARNELL;

BALTIMORE, 1986; JORDÃO; ANDRADE, 2000). A liberação de fatores de crescimento por uma célula pode estimular a proliferação de outras através de estimulação parácrina (IATROPOULOS; WILLIAMS, 1996).

A replicação do DNA, transcrição do RNA e o processamento do RNA mensageiro acontecem em domínios nucleares específicos (SPECTOR, 1993). A arquitetura nuclear então se modifica e se reorganiza, conforme a célula entra em mitose e a degradação da membrana nuclear se inicia, e então a redistribuição das proteínas nucleares acontece. A maioria dessas proteínas se distribui uniformemente no citoplasma, enquanto uma pequena parte se associa a cromossomos condensados das células mitóticas. Entre essas proteínas que se associam aos cromossomos, dois grupos distintos podem ser identificados: aquelas que estão temporariamente conjugadas aos cromossomos e aquelas que permanecem associadas aos cromossomos durante a mitose (MACKAY, 1994; RATTNER, 1992).

Um subgrupo destas proteínas associado aos cromossomos durante a mitose, pode ser encontrado na região nuclear na fase de interfase (RATTNER, 1992), dentre essas proteínas pode ser encontrado o antígeno Ki-67 (GERDES et al., 1983; VERHEIJEN et al., 1989a; VERHEIJEN et al., 1989b).

A função destas proteínas ainda não está esclarecida, mas pode estar associada à condensação e descondensação dos cromossomos, na proteção e estabilização destes cromossomos ou na distribuição simétrica das proteínas nucleares entre as células filhas (STARBORG et al., 1996).

3.7.1.1 Antígeno Ki-67

O antígeno Ki-67 foi inicialmente identificado por Gerdes e colaboradores, ao testarem anticorpos monoclonais contra antígenos nucleares derivados de células tumorais. Observou-se expressão exclusiva em células em proliferação (GERDES et al., 1983; GERDES et al., 1984), o que se tornou muito útil para diagnosticar o desenvolvimento da massa tumoral e seu prognóstico (GERDES, 1990).

O Ki-67 está predominantemente localizado no córtex nuclear em densos componentes de fibrila no núcleo, os quais durante a mitose se associam aos cromossomos condensados de periferia (ISOLA; HELIN; KALLIONIEMI, 1990; VERHEIJEN et al., 1989a, VERHEIJEN et al., 1989b).

Segundo Yu, Woods e Levison (1992) os anticorpos para Ki-67 demonstram antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto as fases G0 e o início da fase G1.

4 Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização dos testes de imuno-histoquímica para os anticorpo anti-bFGF, anti-FGFR1, anti-FGFR2 e anti-Ki-67 utilizaram-se amostras de placentomas de fêmeas da espécie bubalina em diferentes fases da gestação.

4.1 DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL

Segundo Soliman (1975) a idade gestacional dos búfalos pode ser avaliada levando-se em consideração a medida em centímetros do osso frontal da cabeça do feto até o sacro, aplicada em duas fórmulas matemáticas distintas: uma para fetos com medida inferior ou igual a vinte centímetros e outra para fetos com medida em centímetros maiores que vinte.

Fórmula I

$$Y = 29 + (9/2) \cdot X$$

para fetos medindo até 20 cm, na qual Y = idade do feto em dias e X = medida em cm

Fórmula II

$$Y = 74 + (9/4) \cdot X$$

para fetos com medida superior a 20 cm, na qual Y = idade em dias e X = medida em cm

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Foram coletados 13 úteros gravídicos de fêmeas bubalinas com idades gestacionais previamente determinadas, em abatedouros dos Estados de São Paulo e Paraná. Após a retirada dos fetos e avaliação da idade gestacional os úteros foram abertos por um corte em sua curvatura maior, com exposição dos anexos fetais. Três placentomas foram coletados aleatoriamente e perfundidos com solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,2 e em seguida perfundidos com formol tamponado a 4%. Dois cortes foram feitos em seu eixo maior com uma distância de 0,5 cm, que foram seccionados em várias porções de 0,5 cm³. As amostras foram imersas em solução de formol a 4% por vinte e quatro horas a 4°C para fixação dos tecidos. Após vinte e quatro horas as amostras foram lavadas em PBS para retirada do fixador e novamente imersas em PBS por 24 horas a 4°C, antes do início do processo de inclusão.

4.2.1 Preparo do material para inclusão em Histosec®

Em temperatura ambiente o material foi desidratado em uma série crescente de etanol: etanol 70° overnight, etanol 90° por uma hora e duas séries de etanol absoluto de uma hora cada. Em seguida as amostras foram diafanizadas em xilol em duas séries de uma hora cada. Após a diafanização, as amostras foram imersas em dois banhos com Histosec[®] (Merck, Alemanha) por uma hora em estufa a 60°C e incluídos na mesma parafina com auxílio de suportes de metal. Após a polimerização da parafina os blocos foram identificados e armazenados em geladeira até a sua utilização.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA Ki-67, bFGF E SEUS RECEPTORES

Cortes de 5µm foram feitos e colocados sobre lâminas tratadas com APES (aminopropiltrietoxisilano) em estufa a 37°C por 24 horas. As lâminas foram desparafinizadas em dois banhos com xilol de dez minutos cada, seguida de reidratação em uma série decrescente de etanol: dois banhos em etanol absoluto de cinco minutos cada, etanol 96° e 70° também por cinco minutos cada. Em seguida, as lâminas foram imersas em água destilada por cinco minutos e tampão citrato em temperatura ambiente pelo mesmo período. As lâminas foram então submetidas a três banhos em tampão citrato (fervente) por cinco minutos cada no microondas em potência máxima e resfriadas em temperatura ambiente por vinte minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 1% de peróxido de hidrogênio P.A. em metanol previamente resfriado por vinte minutos a -20°C e as lâminas imediatamente lavadas em PBS três vezes por cinco minutos. Outro bloqueio de

reações cruzadas foi feito utilizando-se soro eqüino diluído 1:10 por vinte minutos em câmara úmida em temperatura ambiente.

Os anticorpos primários anti-Ki-67 (Biosource, Estados Unidos, monoclonal clone MB67), anti-bFGF (Upstate, Estados Unidos, monoclonal clone bFM-2), anti-FGFR1 (Upstate, Estados Unidos, monoclonal clone 19B2) e anti-FGFR2 (Sigma, Estados Unidos, policlonal F 0300) foram utilizados nas diluições de 1:10, 1:100, 1:100 e 1:200 respectivamente. Os cortes controle receberam PBS ao invés do anticorpo primário. A incubação com o anticorpo primário foi feita em câmara úmida a 4°C por vinte horas, no mínimo, sem ultrapassar as vinte e quatro horas. Após a incubação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas com PBS três vezes de cinco minutos.

A incubação com o anticorpo secundário universal (Vector Laboratories, Alemanha, BA-1400) na diluição de 1:200 foi feita por vinte minutos em câmara úmida em temperatura ambiente (quadro 1). As lâminas foram lavadas em PBS três vezes de cinco minutos e incubadas com complexo avidina-biotina ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Alemanha), por quarenta e cinco minutos em câmara úmida em temperatura ambiente, lavadas três vezes em PBS e coradas com Nova Red® (Vector Laboratories, Alemanha) por cinco minutos, e finalmente lavadas em água destilada duas vezes por dez minutos.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por dez segundos, lavadas em água corrente por quinze minutos e recobertas com lamínula utilizando-se glicerina tamponada, armazenadas em geladeira por no mínimo quarenta e oito

horas. A análise dos resultados foi feita em microscópio óptico em aumento de 400 vezes e as imagens fotografadas em aumento de 400 e 200 vezes foram obtidas através do programa KS400.

A avaliação da quantidade de sinal nuclear do bFGF, FGFR1, FGFR2 e Ki-67 foi realizada através da observação de cinco campos por corte, ou seja, quinze campos por animal. Quatro tipos celulares foram observados, a saber: epitélio fetal, epitélio materno, estroma fetal e estroma materno. Foram distribuídos os seguintes escores para cada tipo celular em cada campo observado: escore 1 para ausência de reação, escore 2 para reação fraca, escore 3 para reação moderada e escore 4 para reação forte.

Anticorpos primários	Clone (isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor (cat n°)
BFGF	BFM-2	Bovino	1:100	Upstate 05-118
FGFR1	19B2	Camundongo	1:100	Upstate 05-149
FGFR2	Policlonal	Coelho	1:200	Sigma F 0300
Ki-67	MB67	Camundongo	1:10	Biosource AHF0342
Anticorpo secundário	Clone (isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor (cat n°)
Anti mouse/anti rabbit (biotinyado)	IgG (H+L)	Cavalo	1:200	Vector (BA-1400)

Quadro 1: Identificação dos anticorpos primários e secundário utilizados nos testes de imuno-histoquímica.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa estatístico Graph Prism 4.0 no qual foi avaliada a correlação de Pearson (r) entre a expressão do bFGF, FGFR1 e FGFR2 ao longo da gestação na placenta bubalina com aquela do antígeno Ki-67. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

5 Resultados

Avaliou-se através de imuno-histoquímica a expressão da proteína do FGF e seus receptores, bem como a expressão do antígeno Ki-67 na placenta bubalina em diferentes fases da gestação. Após quantificação dos resultados obtidos na imuno-histoquímica, testou-se a existência de correlação entre a expressão nuclear do bFGF, FGFR1 e FGFR2 em relação à expressão do antígeno Ki-67.

5.1 DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL

A idade gestacional dos animais foi avaliada pela medida crown rump o que determinou a divisão dos animais em quatro grupos (Quadro 2).

Nº do animal	Medida em cm	Idade em dias	Média de idade por grupo
1	17	105,5	3,5 meses
2	16	101	
3	16	101	
4	19	114,5	
5	28	137	4,9 meses
6	34	150,5	
7	33	150	
8	34	150,5	
9	75	242	8,5 meses
10	90	276,5	9,4 meses
11	85	265,5	
12	94	285,5	
13	99	296,5	

Quadro 2: Determinação da idade gestacional através da medida crown rump

Grupo 1: 3 meses (90 dias), que compreendeu animais com idade gestacional entre 70 e 115 dias. Grupo 2: 5 meses (150 dias), idade gestacional entre 137 e 150 dias.

Grupo 3: 8 meses (240 dias), idade gestacional de 242 dias. Grupo 4: 10 meses (300 dias), compreendendo 274 e 300 dias de gestação.

5.2 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO bFGF E SEUS RECEPTORES

A localização tecidual do bFGF e seus receptores foi feita através do teste de imunohistoquímica: observou-se que as proteínas deste sistema localizam-se tanto no citoplasma quanto no núcleo das células do estroma fetal, epitélio fetal, epitélio materno e estroma materno. Além disso, observou-se localização citoplasmática e nuclear das proteínas testadas em células endoteliais, células estas relacionadas à angiogênese e portanto, não relacionadas diretamente a este estudo. Os resultados da avaliação quantitativa da expressão do bFGF e seus receptores bem como do Ki-67 ao longo da gestação serão descritos conjuntamente com os resultados de correlação entre estes e o antígeno Ki-67.

5.2.1 Imunolocalização do bFGF

Os testes de imuno-histoquímica permitiram a observação de reações positivas para alguns tipos celulares e negativas para outros nas diferentes fases da gestação estudadas.

5.2.1.1 Reação nuclear do bFGF

A reação nuclear do bFGF nos animais do grupo 1 foi fraca nas células dos estromas fetal e materno e forte nos epitélios fetal e materno (Figura 6 A). O grupo 2 apresentou reação fraca para o bFGF no núcleo das células dos estromas fetal e materno bem como do epitélio materno e moderada nas células do epitélio fetal (Figura 6 B). O animal do grupo 3 apresentou reação fraca nos estromas fetal e materno, reação forte no epitélio fetal e moderada no epitélio materno (Figura 6 C). Os animais do grupo 4 apresentaram reação fraca no estroma fetal, moderada no estroma e epitélio maternos e forte no epitélio fetal (Figura 6 D).

5.2.1.2 Reação citoplasmática do bFGF

Considerando os animais do grupo 1, foi possível observar que o estroma fetal apresentou reação negativa, já os epitélios fetal e materno apresentaram reação positiva forte e o estroma materno reação positiva fraca (Figura 6 A). Nos animais do grupo 2, o estroma fetal também apresentou reação negativa para o bFGF, o epitélio fetal e o estroma materno apresentaram reação moderada para o bFGF e o epitélio materno apresentou reação forte (Figura 6 B). O animal do grupo 3 apresentou reação negativa para o estroma fetal, forte reação para o bFGF no epitélio fetal, tendo o epitélio e o estroma maternos apresentado reação moderada para o bFGF (Figura 6 C). Nos animais do grupo 4 houve reação negativa para o estroma fetal e reação moderada para os epitélios fetal e materno e reações fracas para o estroma materno (Figura 6 D).

Figura 6 – Fotomicrografias da localização da proteína do bFGF na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal bFM-2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o fator de crescimento em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm

5.2.2 Imunolocalização do FGFR1

Os testes de imuno-histoquímica permitiram a observação de reações positivas para alguns tipos celulares e negativas para outros nas diferentes fases da gestação estudadas.

5.2.2.1 Reação nuclear para o FGFR1

Os animais do grupo 1 apresentaram reação fraca e moderada para os estromas fetal e materno, respectivamente, reação moderada no epitélio fetal e forte no epitélio materno (Figura 7 A). Nos animais do grupo 2 a reação foi negativa no estroma materno, fraca no estroma fetal e moderada nos epitélios materno e fetal (Figura 7 B). No grupo 3, os estromas fetal e materno apresentaram reação negativa e os epitélios fetal e materno uma reação fraca (Figura 7 C). Os animais do grupo 4 apresentaram reação fraca nos estromas fetal e materno, reação ausente no epitélio fetal e moderada no epitélio materno (Figura 7 D).

5.2.2.2 Reação citoplasmática para o FGFR1

Os animais do grupo 1 apresentaram reação negativa para o estroma fetal, fraca para o estroma materno e reação forte para os epitélios fetal e materno (Figura 7 A). Os animais do grupo 2 apresentaram reação negativa para o estroma fetal, reação moderada para os epitélios fetal e materno e reação fraca para o estroma materno (Figura 7 B). O grupo 3 apresentou reação negativa para o estroma fetal, fraca para os epitélios fetal e materno bem como para o estroma materno (Figura 7 C). Os animais do grupo 4 apresentaram reação negativa para o estroma fetal, moderada para o epitélio fetal e materno e fraca para o estroma materno (Figura 7 D).

Figura 7 - Fotomicrografias da localização da proteína do FGFR1 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal 19B2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o receptor do fator de crescimento em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm

5.2.3 Imunolocalização do FGFR2

Os testes de imuno-histoquímica permitiram a observação de reações positivas para alguns tipos celulares e negativas para outros nas diferentes fases da gestação estudadas.

5.2.3.1 Reação nuclear para o FGFR2

Os animais do grupo 1 apresentaram reação negativa no estroma materno, fraca no estroma fetal e epitélio materno e moderada no epitélio fetal (Figura 8 A). Os animais do grupo 2 também apresentaram reação negativa no estroma materno, mas apresentaram reação fraca nos epitélios fetal e materno e estroma fetal (Figura 8 B). O grupo 3 apresentou reação fraca no estroma fetal e moderada no epitélio fetal; reação fraca no epitélio e ausente no estroma maternos (Figura 8 C). No grupo 4 a reação foi negativa no estroma materno, fraca no estroma fetal e moderada nos epitélios fetal e materno (Figura 8 D).

5.2.3.2 Reação citoplasmática para o FGFR2

Considerando os animais do grupo 1, foi possível observar que o estroma fetal apresentou reação negativa para o FGFR2, os epitélios fetal e materno apresentaram reação moderada e o estroma materno também apresentou reação negativa (Figura 8 A). Os animais pertencentes ao grupo 2 apresentaram reação negativa no estroma fetal, forte no epitélio materno e moderada no epitélio fetal e no estroma materno (Figura 8 B). O grupo 3 apresentou reação negativa no estroma fetal, fraca no epitélio fetal, moderada no epitélio materno e fraca no estroma materno (Figura 8 C). Considerando os animais do grupo 4 foi possível observar ausência de reação no estroma fetal, o epitélio fetal apresentou fraca reação para o FGFR2, assim como o epitélio materno e o estroma materno (Figura 8 D).

Figura 8 - Fotomicrografias da localização da proteína do FGFR2 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti FGFR2. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o receptor do fator de crescimento em células do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm

5.3 IMUNOLocalização DO ANTÍGENO Ki-67

Os testes de imuno-histoquímica permitiram a observação de reações positivas para alguns tipos celulares e negativas para outros nas diferentes fases da gestação estudadas. A localização do antígeno Ki-67 é exclusivamente nuclear. Os animais do grupo 1 apresentaram reação fraca nos estromas e epitélios materno e fetal (Figura 9 A), assim como os animais do grupo 2 (Figura 9 B). O grupo 3 apresentou reação negativa nos estromas fetal e materno, fraca no epitélio fetal e moderada no epitélio materno (Figura 9 C). Os animais do grupo 4 apresentaram reação fraca nos estromas fetal e materno, moderada no epitélio materno e fraca no epitélio fetal (Figura 9 D).

Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína do Ki-67 na placenta de búfalos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal MB67. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. Observar a reação nuclear positiva para o antígeno nuclear em células do estroma materno (seta), do epitélio materno (seta vazia), do epitélio fetal (ponta de seta vazia) e do estroma fetal (ponta de seta). Barra: 100µm

Figura 10 - Fotomicrografias de placenta bubalina aos 150 dias de gestação. Controle negativo das reações de imuno-histoquímica para Ki-67 (A), bFGF (B), FGFR1 (C) e FGFR2 (D): adição de PBS ao invés do respectivo anticorpo primário. Barra: 100µm

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO BFGF, FGFR1 E FGFR2 EM RELAÇÃO À DO ANTÍGENO KI-67 AO LONGO DA GESTAÇÃO NA PLACENTA BUBALINA

A fim de se avaliar a atividade proliferativa do bFGF através da ligação a seus receptores FGFR1 e FGFR2 na placenta bubalina ao longo da gestação, quantificou-se a expressão nuclear das proteínas do bFGF, FGFR1, FGFR2 e Ki-67 para posterior realização de testes estatísticos de correlação de Pearson (r) (Apêndice 4) para os diferentes tipos celulares analisados e também para todos os tipos celulares em conjunto.

A expressão do bFGF e seus receptores bem como do Ki-67 nos diferentes tipos celulares não obedece ao mesmo padrão de aumento e diminuição ao longo da gestação. Embora os dados de expressão individual ao longo da gestação do bFGF e seus receptores e os do Ki-67 não tenham sido submetidos à análise estatística, a observação das Figuras a seguir fornece os seguintes dados:

No epitélio materno aos 90 dias de gestação, a expressão do bFGF é máxima em relação aos outros períodos gestacionais estudados; ocorre uma diminuição desta expressão aos 150 dias com posterior elevação e estabilização da mesma a partir dos 240 dias de gestação (Figura 11 A). A expressão do antígeno Ki-67 no epitélio materno diminui gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 11 A). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,282 ($p = 0.036$).

No epitélio fetal aos 90 dias de gestação, a expressão do bFGF é máxima em relação aos outros períodos gestacionais estudados; ocorre uma diminuição desta expressão aos 150 dias com posterior elevação aos 240 dias e novo decréscimo quando a gestação atinge os 300 dias (Figura 11 B). A expressão do antígeno Ki-67

no epitélio fetal atinge seu máximo aos 240 dias e diminui quando a gestação alcança os 300 dias (Figura 11 B). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,313 ($p = 0.019$).

No estroma materno a expressão do bFGF diminui dos 90 aos 240 dias de gestação e volta a se elevar próximo ao termo (300 dias de gestação) (Figura 11 C). A expressão do antígeno Ki-67 no estroma materno, assim como no epitélio materno, diminui gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 11 C). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) negativo de - 0,203, porém estatisticamente não significativo ($p = 0.133$).

No estroma fetal, a expressão do bFGF parece não se alterar dos 90 aos 240 dias de gestação e decresce próximo ao termo (300 dias de gestação) (Figura 11 D). A expressão do antígeno Ki-67 no estroma fetal aumenta aos 150 dias em relação aos 90 dias de gestação, diminui aos 240 dias e volta a aumentar aos 300 dias da gestação (Figura 11 D). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,469, altamente significativo ($p = 0.0003$).

Figura 11 – Correlação (r) da expressão do bFGF (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = 0,282$); B: expressão em células do epitélio fetal ($r = 0,313$); C: expressão em células do estroma materno ($r = - 0,203$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,469$)

No epitélio materno tanto a expressão do FGFR1 quanto a do antígeno Ki-67 diminuem gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 12 A). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,739, valor altamente significativo ($p < 0.0001$).

No estroma materno a expressão do FGFR1 diminui gradativamente dos 90 aos 240 dias de gestação e parece se estabilizar até os 300 dias de gestação (Figura 12 B). A expressão do antígeno Ki-67 no estroma materno, assim como no epitélio materno, diminui gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 12 B). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) 0,511, valor altamente significativo ($p < 0.0001$).

No epitélio fetal, enquanto a expressão da proteína do FGFR1 atinge seu mínimo aos 240 dias de gestação seguida de estabilização até os 300 dias de gestação (Figura 12 C), a expressão do antígeno Ki-67 atinge seu máximo aos 240 dias e diminui quando a gestação alcança os 300 dias (Figura 12 C). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) negativo de - 0,211, estatisticamente não significativo ($p = 0.118$).

No estroma fetal, a expressão do FGFR1 (Figura 1 D) mimetiza a expressão do antígeno Ki-67 aumentando aos 150 dias em relação aos 90 dias de gestação, diminuindo aos 240 dias e aumentando novamente aos 300 dias da gestação (Figura 12 D). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,358 ($p = 0.0068$).

Figura 12 – Correlação (r) da expressão do FGFR1 (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = 0,739$); B: expressão em células do estroma materno ($r = 0,511$); C: expressão em células do epitélio fetal ($r = -0,211$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,358$)

A expressão do FGFR2 no epitélio materno diminui aos 150 em relação aos 90 dias de gestação, é máxima em relação aos outros períodos gestacionais estudados aos 240 dias e parece diminuir ligeiramente até os 300 dias (Figura 13 A). A expressão do antígeno Ki-67 no epitélio materno diminui gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 13 A). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) negativo de -0,027 ($p = 0.841$).

No estroma materno a expressão do FGFR2 se comporta como a expressão do mesmo no epitélio materno: diminui aos 150 em relação aos 90 dias de gestação, é máxima em relação aos outros períodos gestacionais estudados aos 240 dias e parece diminuir ligeiramente até os 300 dias (Figura 13 B). A expressão do antígeno Ki-67 no estroma materno, assim como no epitélio materno, diminui gradativamente do dia 90 ao dia 300 da gestação (Figura 13 B). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) 0,165, porém estatisticamente não significativo ($p = 0.226$).

No epitélio fetal, a expressão do FGFR2 (Figura 13 C) acompanha a expressão do antígeno Ki-67: atinge seu máximo aos 240 dias e diminui quando a gestação alcança os 300 dias (Figura 13 C). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,384 ($p = 0.0035$).

No estroma fetal, a expressão do FGFR2 diminui dos 90 aos 240 dias de gestação e permanece estabilizada até os 300 dias de gestação (Figura 13 D). A expressão do antígeno Ki-67 no estroma fetal aumenta aos 150 dias em relação aos 90 dias de gestação, diminui aos 240 dias e volta a aumentar aos 300 dias da gestação (Figura 13 D). A análise da correlação entre os dois parâmetros descritos resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,268 ($p = 0.0461$).

Figura 13 – Correlação (r) da expressão do FGFR2 (linha tracejada) em relação à do Ki-67 (linha contínua) nos diferentes tipos celulares nos períodos gestacionais estudados (90, 150, 240 e 300 dias de gestação). A: expressão em células do epitélio materno ($r = -0,027$); B: expressão em células do estroma materno ($r = 0,165$); C: expressão em células do epitélio fetal ($r = 0,384$) e D: expressão em células do estroma fetal ($r = 0,268$)

Se observada a expressão do bFGF correlacionada à do antígeno Ki-67 em todos os tipos celulares estudados ao longo da gestação, obtém-se um coeficiente de correlação de Pearson de 0,29, altamente significativo ($p < 0.0001$); para a expressão do FGFR1, nas mesmas condições, a correlação obtida foi de 0,46, também altamente significativa ($p < 0.0001$) e para o FGFR2 a correlação foi de 0,30 e o nível de significância menor que 0,0001.

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

Ao ser consultada a literatura relacionada ao bFGF e seus receptores FGFR1 e FGFR2, observou-se que este é o primeiro trabalho a relatar a presença deste fator de crescimento e seus receptores na placenta bubalina ressaltando o perfil de expressão em diferentes fases da gestação. Mesmo sem a realização de métodos de análise quantitativa deste fator de crescimento e seus receptores 1 e 2, foi possível observar que a técnica de imuno-histoquímica detecta mudanças qualitativas relacionadas à expressão destas proteínas ao longo da gestação na espécie bubalina. A proliferação das células placentárias nesta espécie também foi abordada e, a partir dos resultados obtidos, sugere-se uma correlação positiva entre a expressão do bFGF e seus receptores e o processo de proliferação na placenta bubalina. A metodologia utilizada e os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho optou-se pela fixação do material em formol tamponado a 4 % para a melhor visualização da expressão nuclear do bFGF e seus receptores. Uma fixação opcional poderia ter sido o Bouin (430 ml de ácido pícrico, 20 ml de ácido acético e 50 ml de formol), no entanto, a presença do ácido pícrico, que torna este fixador um “fixador forte”, impede a visualização da expressão nuclear destas proteínas, principalmente quando a técnica de fluoresceína é

utilizada (RENKO et al., 1990). Além disso, outros autores (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003; COOREIA-DA-SILVA et al., 2004; GEVA et al., 2002; GOL et al., 2004; ZHENG et al., 1997) relataram resultados satisfatórios utilizando os anticorpos selecionados e a fixação do material em formol tamponado.

A escolha do anticorpo monoclonal anti-bFGF (clone bMF-2, Upstate, Estados Unidos), foi baseada nas observações de Weise (2001), que utilizou este anticorpo para avaliar a expressão desta proteína na placenta de bovinos e por não apresentar reação cruzada com o Fator de Crescimento Fibroblástico ácido (aFGF). Os anticorpo anti-FGFR1 foi escolhido por ser um anticorpo monoclonal e o anti-FGFR2 foi eleito por ser de procedência confiável e um dos únicos anticorpos existentes contra o FGFR2.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Embora o enfoque deste trabalho recaia sobre a atividade proliferativa do bFGF em tipos celulares específicos da placenta bubalina, considera-se necessário ressaltar que a atividade angiogênica deste fator de crescimento foi bastante estudada e é importante para a manutenção da gestação (CHARNOCK-JONES; KAUFMANN; MAYHEW, 2004; FOLKMAN, 1987; FOLKMAN, 1995; NAKAGAWA; FUJIMOTO; TAMAYA, 2004; REYNOLDS; REDMER, 1995; TORRY; HINRICHS; TORRY, 2004; ZYGMUNT et al., 2003). Avaliou-se, portanto, se a atividade proliferativa do bFGF

por meio da ligação aos seus receptores 1 e 2, também poderia ser responsável pela proliferação das células dos epitélios e estromas materno e fetal.

Sabe-se que a angiogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, de maneira que a gestação pode ser interrompida caso este processo não aconteça a partir de um balanço ideal entre os fatores estimuladores e inibidores da angiogênese (ZYGMUNT et al., 2003). A angiogênese fisiológica no adulto é restrita ao trato reprodutor feminino, relacionando-se às alterações cíclicas que ocorrem nos ovários, útero, placenta e glândula mamária (AUGUSTIN, 2000).

Já está bem estabelecido que dentre os fatores de crescimento descritos até o momento, o bFGF é considerado um dos principais estimuladores da angiogênese de tecidos (BIKFALVI et al., 1997, BURGESS; MACIAG, 1989; GOSPODAROWICZ, 1990; NUGENT; IOZZO, 2000; THOMAS, 1987). A estimulação da angiogênese acontece por meio da ativação da transdução de sinal mediada pela ativação de receptores relacionados à tirosina quinase; como consequência acontece o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos maternos, permitindo a invasão e o crescimento das células endoteliais e novos leitos vasculares (ZYGMUNT et al., 2003).

Segundo Moura et al. (2003) o tratamento superovulatório a partir de gonadotrofinas exógenas em corpo lúteo de búfalos aumenta a densidade vascular deste órgão temporário. O grupo superovulado apresentou maior densidade vascular que o grupo não tratado. Este aumento da densidade vascular observado nos animais do grupo tratado pode estar relacionado ao aumento da expressão do VEGF pelo corpo

lúteo (Moura, 2003), talvez em associação ao aumento da expressão do bFGF. Prado et al. (2004) observaram um aumento da expressão da proteína e do RNAm do bFGF não só pelas células endoteliais do corpo lúteo, mas também células perivasculares e luteínicas de fêmeas bubalinas submetidas ao tratamento superovulatório.

O bFGF é um potente estimulador da atividade mitogênica de inúmeros tipos celulares, como células do sistema nervoso, células de origem mesodérmica e endodérmica, bem como células endoteliais (BAIRD; BOHLEN, 1990; BURGESS; MACIAG, 1989; GOSPODAROWICZ et al., 1987; KLAGSBRUN, 1990; RIFKIN; MOSCATELLI, 1989). Segundo Grazul-Bilska et al. (1991), foi possível observar aumento da proliferação de células luteínicas de ovinos quando tratadas com bFGF, apontando para a importância deste fator como agente indutor da proliferação de outros tipos celulares, que não o endotelial, presentes em órgão endócrinos temporários.

O bFGF é um importante controlador da proliferação, da diferenciação e da migração celular capaz de estimular a proliferação de células trofoblásticas placentárias (CATTINI et al., 1991; FERRIANI, 1994). Faz parte de uma família de fatores de crescimento ligados a heparina e estão localizados em várias células, incluindo as células maternas e fetais da placenta ovina (REYNOLDS; REDMER, 2001).

Tem sido demonstrado por diversos autores que o bFGF é produzido pelos tecidos placentários maternos e fetais durante a gestação (BRIGSTOCK, 1991; MADDOCK

et al., 1999; RIDER; PIVA, 1998; ZHENG et al., 1995; ZHENG et al., 1998). Segundo Shams, Ahmed (1994) e Cattini et al. (1991) a parte materna e também a parte fetal da placenta humana são locais de expressão do bFGF.

Segundo Pfarrer et al. (2003) foi possível observar a presença do RNAm do bFGF nas células placentárias maternas e fetais bovinas a partir de 80 dias de gestação até o período próximo ao parto. Este trabalho descreve a presença da proteína do bFGF nas células placentárias maternas e fetais a partir de 101 dias de gestação até o período próximo ao parto (300 dias de gestação) na placenta bubalina. As diferenças encontradas em relação à expressão da proteína ao longo da gestação na placenta bubalina apontam para necessidades específicas deste fator em determinados períodos gestacionais. No epitélio materno a expressão do bFGF é alta no início da gestação, diminui aos 150 dias e aumenta novamente ao final da gestação. No estroma materno observa-se um aumento na expressão do bFGF aos 150 dias, diminuição na fase de 242 dias e aumento no final da gestação.

A expressão desta proteína no epitélio fetal, assim como no epitélio materno, é alta no início da gestação, diminui no período de 150 dias, aumenta no período de 242 dias e volta a diminuir na fase final da gestação. No estroma fetal, a expressão é praticamente constante até o período de 242 dias e observa-se diminuição da expressão no final da gestação.

Esses resultados apontam para um maior envolvimento do bFGF na parte materna da placenta bubalina no início e ao final da gestação; já na parte fetal no início e aos

242 dias de gestação. Apesar da falta de animais na fase de 242 dias, ou 8 meses de gestação, optou-se por descrever os dados obtidos para este único animal pela importância funcional que a placenta apresenta nesta fase. Sabe-se que a placenta bovina é capaz de produzir quantidades suficientes de progesterona para manter a gestação entre 180 e 250 dias (DAY, 1977; ESTERGREEN et al., 1967; JOHNSON et al., 1981). Para a espécie bubalina este intervalo gestacional ainda não foi especificado, mas supõe-se este aumento de capacidade esteroideogênica da placenta ocorra aproximadamente no mesmo período. Foi descrito por Campos (2005) o envolvimento do bFGF na modulação da produção de progesterona pelas células da placenta bovina em cultura. A depender da fase gestacional estudada, a adição do bFGF ao meio de cultura resultou em maior produção de progesterona. É provável que este fator desempenhe papel semelhante na placenta bubalina e seja um dos responsáveis pelo aumento da síntese de progesterona pelas células do trofoblasto, a qual provavelmente ainda ocorra aos 242 dias de gestação.

A fase final da gestação é caracterizada pelo elevado aumento na síntese de progesterona pela parte materna da placenta (SHEMESH; HANSEL; STRAUSS III, 1984) e pode estar relacionada à maior expressão deste fator pelos tecidos maternos, como observado neste presente estudo.

Observações feitas por Ferriani et al. (1994) descrevem que a expressão do bFGF é menor nas células da placenta ao final da gestação quando comparada com a sua expressão no início da gestação. Wei et al. (2004), ao analisarem a espécie de macaco Rhesus, observaram uma diminuição na expressão da proteína e do RNAm do bFGF no trofoblasto de acordo com o avanço da gestação. Essas observações

são condizentes com os resultados observados no presente estudo, uma vez que a expressão da proteína do bFGF diminuiu após o terceiro mês de gestação. A diminuição da expressão do bFGF na placenta ao final da gestação pode estar relacionada à diminuição geral da transcrição gênica nesta fase (BLASIO et al., 1997).

A importância do bFGF na placenta foi descrita também desde estágios iniciais do desenvolvimento em estudos realizados *in vitro* por (GRUNDKER; KIRCHNER, 1996). Os efeitos do IGF-1, IGF-2 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) e bFGF foram avaliados durante a formação do trofoblasto a partir de cultura de blastocistos de coelhos: observou-se a expressão da proteína do bFGF no blastocisto em fase inicial de gestação apontando para a importância deste fator de crescimento na formação do trofoblasto.

Embora os resultados obtidos neste trabalho para placenta bubalina sejam condizentes com a expressão descrita para placentas bovina (PFARRER et al., 2003; INFORMAÇÃO VERBAL¹) e ovina (REYNOLDS; REDMER, 2001) e para com as variações de expressão do bFGF no sinciciotrofoblasto da placenta humana (ARANY; HILL, 1998) e primata (WEI et al., 2004), é importante salientar que a expressão deste fator na espécie bubalina nem sempre obedece ao mesmo padrão descrito para bovinos, como relatado por Prado et al. (2004) para as variações de expressão do bFGF no corpo lúteo ao longo do ciclo estral. No referido trabalho foi observada intensidade de expressão praticamente constante do bFGF durante a fase luteínica, leve aumento de expressão na fase de corpo lúteo em regressão e

¹ Informação verbal fornecida por Danila Barreiro Campos, 2005.

ausência de expressão na fase de corpo albicans nos bovinos. Já os bubalinos apresentaram intensa variação durante o ciclo estral: maior expressão do bFGF foi observada na fase de corpo lúteo maduro e a fase de corpo albicans, ao contrário da espécie bovina, apresentou expressão do fator em células endoteliais, perivasculares e do estroma, apenas as células luteínicas apresentaram ausência de reação.

A expressão do RNAm do FGFR1 foi observada nas células maternas e fetais da placenta bovina a partir de 80 dias de gestação até o período próximo ao parto (PFARRER et al., 2003). Campos (2005) descreve a presença da proteína em placenta bovina a partir dos 90 dias de gestação. No presente trabalho foi possível observar a presença da proteína do FGFR1 nas células dos estromas e epitélios maternos e fetais a partir de 101 dias de gestação e por todo período gestacional.

Segundo Wei et al. (2004) a expressão do FGFR1 foi mais intensa na parte fetal da placenta do macaco Rhesus. Em seus estudos foi possível observar também que as células endoteliais de capilares não expressaram a proteína deste receptor, sugerindo que este receptor deva estimular outras funções do bFGF, que não a de angiogênese. Os resultados do presente trabalho demonstram que a expressão deste receptor foi alta no citoplasma das células do epitélio fetal e no citoplasma e núcleo das células do epitélio materno. Nas células do estroma materno e fetal houve expressão do FGFR1, mas esta foi mais alta no início da gestação.

Estudos realizados in vitro por Shanga et al. (1997) sugerem que o FGFR1 participa da modulação da maturação e regeneração dos tecidos uterinos. Wei et al (2004)

sugerem ainda que o FGFR1 module a estimulação da proliferação e diferenciação do trofoblasto através da sinalização de vias autócrinas e parácrinas durante os primeiros estágios da gestação de primatas.

A utilização de ratos transgênicos (inserção de um novo gene –neo- no quinto exon do receptor FGFR1, que é expresso por todas as suas isoformas, bloqueando suas funções) permitiu verificar a participação do FGF na embriogênese. As alterações na formação do endométrio e no crescimento tecidual observadas nestes ratos transgênicos sugerem que o FGFR1 está presente na fase de embriogênese do rato e que estimula e controla a proliferação celular (DENG et al., 1994; YAMAGUCHI et al., 1994). O RNAm do FGFR1 é mais expresso em células endometriais de porcas no dia 1 em comparação ao dia 12 da gestação (WELTER; WOLLENHAUPT; EINSPANIER, 2004). A presença de esteróides placentários pode modular a atividade proliferativa da placenta, bem como sua função (HOFFMANN; SCHULER, 2002). Segundo Welter; Wollenhaupt e Einspanier (2004) o diferente padrão de expressão do FGFR1 observado concomitantemente à presença de esteróides luteínicos está relacionado a um complexo mecanismo de regulação deste receptor que modula a atividade proliferativa, diferenciação e angiogênese nas células do estroma e epitélio maternos de suínos.

A expressão do RNAm do FGFR2 foi observada nas células maternas e fetais da placenta bovina a partir de 80 dias de gestação e ao longo do processo gestacional (PFARRER et al., 2003). No presente trabalho foi possível observar a presença da proteína do FGFR2 nas células dos estromas e epitélios maternos e fetais partir de 101 dias de gestação e por todo período gestacional. Neste presente estudo foi

possível observar que a expressão do FGFR2 não é constante ao longo da gestação, sendo que a expressão desta proteína foi maior no início da gestação e na fase correspondente a 242 dias. Campos (Informação pessoal²) observou a expressão da proteína do FGFR2 na placenta bovina: nas células do estroma materno a expressão deste receptor diminuiu e voltou a aumentar a partir de 210 dias de gestação até o período anterior ao parto. Nas células do epitélio materno houve aumento da expressão, mas diminuiu ao final da gestação. O epitélio fetal apresentou uma maior variação em relação à expressão deste receptor, que permaneceu igual até 150 dias de gestação, seguida por aumento na fase seguinte e diminuição no período próximo ao parto. Nas células do estroma fetal houve diminuição da expressão com 150 dias de gestação, seguida por aumento, e assim permaneceu até o final da gestação. O FGFR2 foi altamente expresso pelas células endometriais tanto no dia 1 quanto no dia 12 da gestação de suínos (WELTER, WOLLENHAUPT, EINSPANIER, 2004). Já Baczyk et al. (2005), ao avaliarem a expressão do FGFR2 nas células trofoblásticas de ratos, observaram que a expressão desta proteína diminui ao longo da gestação.

O FGFR2 é expresso principalmente por células epiteliais (ORR-URTREGER et al., 1991; ORR-URTREGER et al., 1993; PETERS et al., 1992). Segundo Xu et al. (1998) esta proteína é essencial para a fusão corioalantóica e para a modulação da atividade proliferativa do trofoblasto, devido ao fato de linhagens celulares de células tronco embrionárias transfectadas com pFGFR2neo (um inibidor da atividade do FGFR2) originar bloqueio da atividade proliferativa do epitélio fetal, ocasionando má formação da porção labiríntica da placenta de ratos. Este estudo permitiu também a

² Informação verbal fornecida por Danila Barreiro Campos, 2005.

observação da importante correlação entre a expressão desta proteína e o estímulo da atividade mitogênica para a proliferação e formação da parte trofoblástica da placenta. Essas observações estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os quais apontam para a modulação da atividade proliferativa do bFGF através da ligação com seu receptor FGFR2 nas células do epitélio fetal, como será discutido em conjunto com os resultados de correlação.

Assim como demonstrado por Davis et al. (1997) e Joy et al (1997) muitos pesquisadores observaram a localização nuclear do bFGF e também de seus receptores (GONZALEZ et al., 1995; HSIA; RICHARDSON; NUGENT, 2003; STACHOWIAK et al., 1997). O presente trabalho evidenciou a expressão nuclear das proteínas do bFGF, FGFR1 e FGFR2 nas células do estroma e epitélio maternos e fetais da placenta bubalina ao longo da gestação. Foi possível também observar a expressão citoplasmática deste fator de crescimento e seus receptores na placenta bubalina, no entanto, optou-se pela contagem do sinal nuclear para realização dos testes de correlação, uma vez que a atividade proliferativa do bFGF a partir da ligação a seus receptores acontece preferencialmente no núcleo (ARESE et al., 1999; FENG et al., 1996; RENKO et al., 1990).

A expressão nuclear do bFGF pode ser observada em células da placenta humana (CATTINI et al., 1991). Em estudos realizados por Davis et al. (1997) e Quarto et al. (1991) foi observado que as isoformas do bFGF localizadas no núcleo apresentaram maior eficiência no aumento da síntese de DNA que a isoforma de baixo peso molecular, a qual não foi localizada no núcleo até o momento. Foi demonstrado também que a expressão do bFGF e seu receptor FGFR1 no núcleo é

correlacionada à proliferação de astrócitos e está constitutivamente presente em núcleos de proliferação contínua de gliomas (JOY et al., 1997).

Em estudos realizados por Stachowiak et al. (1997) foi possível observar a presença da proteína do FGFR1 por meio de imuno-citoquímica confocal no núcleo de gliomas. Neste mesmo estudo, a técnica de Western blot revelou a presença de três isoformas do FGFR1: as de 103, 118 e 145 kDa, as quais apresentam os domínios C e N-terminal. Segundo o autor, o FGFR1 localizado no núcleo mantém a atividade quinase.

Ainda segundo Stachowiak et al. (1997) gliomas que originalmente não expressam o FGFR1 e que foram transfectados com pcDNA3.1-FGFR1 passaram a apresentar reação nuclear para o FGFR1, aumento da atividade proliferativa celular e estimulação para a passagem de G0/G1 para S no ciclo celular. Estes resultados indicam que a presença constitutiva do FGFR1 nuclear estimula a proliferação de gliomas e, no caso da placenta bubalina, objeto de estudo deste trabalho, pode estimular a proliferação do epitélio materno, estromas materno e fetal, como sugerido a partir da análise dos dados de correlação.

Está bem estabelecido que o bFGF atua como estimulador da atividade proliferativa e o Ki-67 é um conhecido e eficiente marcador da atividade proliferativa celular, expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em fase G0 e o início da fase G1. Outros marcadores de proliferação celular são o BrdU (bromodeoxyuridine) e o PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Entretanto, o BrdU é incorporado durante a fase S, permitindo a marcação apenas das células que se encontram nesta fase. Já

o PCNA é necessário para que ocorra a síntese do DNA, mas pode apresentar diferentes padrões de coloração de acordo com o fixador utilizado (YU; WOODS; LEVISON, 1992).

Durante a gestação o útero passa por intensas alterações morfológicas a fim de acomodar o crescimento do concepto. Os tecidos placentários maternos e fetais sofrem intensa proliferação celular ao longo da gestação, bem como diferenciação e migração e sofrem também apoptose que é inversamente relacionada à atividade proliferativa (CORREIA-DA-SILVA et al., 2004). Este trabalho descreve a expressão do antígeno Ki-67 durante a gestação, o qual foi detectado a partir de 101 dias de gestação nas células dos estromas e epitélios maternos e fetais da placenta de fêmeas bubalinas.

Foi descrito que o tecido uterino de ratas gestantes atinge seu desenvolvimento máximo com doze dias de gestação, apresentando intensa atividade proliferativa. A partir do décimo quarto dia ocorre diminuição do desenvolvimento uterino, acompanhada pela diminuição da atividade proliferativa, a qual persiste até o final da gestação (WELSH; ENDERS, 1985; WELSH; ENDERS, 1991).

Em bovinos o antígeno Ki-67 pode ser localizado na maioria das células do epitélio materno da placenta e sua expressão diminui ao término da gestação (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003). Ambas as observações são condizentes com as encontradas no presente trabalho para o epitélio materno, uma vez que a expressão deste marcador de proliferação celular diminui gradativamente entre o início (101 dias) e o término (300 dias) da gestação. Entretanto Hoffmann e Schuler (2002)

observaram que a expressão do antígeno Ki-67 nas células da placenta bovina não diminui ao final da gestação.

Segundo Boos; Janssen e Mülling (2003), as células do epitélio fetal da placenta bovina apresentaram diminuição da expressão desta proteína ao longo da gestação. O epitélio fetal apresentou um pico de marcação para Ki-67 aos 242 dias de gestação, o que pode estar relacionado ao possível desenvolvimento exponencial do feto nesta etapa exigindo do útero aumento da sua atividade proliferativa a fim de acomodar o conceito. No entanto, nesta fase foi possível observar apenas um animal e as inferências deverão ser comprovadas posteriormente com maior número de animais. Em estudos realizados por Hoffmann e Schuler (2002) foi possível observar que houve diminuição da expressão do antígeno Ki-67 nas células do epitélio fetal aos 220 dias, seguido por intenso aumento até o período próximo ao parto.

Segundo Boos; Janssen e Mülling (2003), a imunoreatividade ao antígeno Ki-67 nas células do epitélio fetal e materno da placenta de bovinos indica que a proliferação celular é fundamental para a manutenção da gestação e conforme o avanço da gestação, esta expressão se torna muito mais presente na porção materna que na fetal, o que se reflete nas observações macro e microscópicas de cada compartimento. O compartimento materno apresenta maior capacidade de crescimento que o fetal (BKÖRKMAN, 1954; BJÖRKMAN, 1969; FERRELL, 1991; LAVEN; PETERS, 2001; PRIOR; LASTER, 1979). Essas observações estão de acordo com os achados deste presente estudo, que por meio de testes de imuno-

histoquímica, determinou uma maior expressão deste marcador de proliferação celular pelas células do epitélio materno que do fetal. Esta alta expressão do antígeno Ki-67 pelas células do epitélio materno da placenta bovina indicam que a proliferação elevada pode estar relacionada à nutrição do feto (BKÖRKMAN, 1954; BJÖRKMAN, 1969; BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003; HOFFMANN; SCHULER, 2002). As células do estroma materno e fetal da placenta bovina apresentam baixa expressão do antígeno Ki-67 ao longo da gestação (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003; HOFFMANN; SCHULER, 2002) como observado no presente trabalho.

Segundo Hoffmann e Schuler (2002) houve diminuição da expressão do antígeno Ki-67 nas células do estroma materno com 220 dias, seguido por intenso aumento até o parto. As células do estroma fetal, assim como as células do estroma materno, apresentaram diminuição seguida por aumento, entretanto houve diminuição da expressão do antígeno Ki-67 no período final da gestação. Neste presente trabalho a expressão do antígeno Ki-67 nas células do estroma materno diminuiu ao longo da gestação. Nas células do estroma fetal houve aumento, seguido por diminuição e novo aumento, padrão de expressão semelhante ao observado anteriormente, exceto pelo período final da gestação que neste presente estudo foi acompanhado por diminuição da expressão deste marcador de proliferação celular.

Ao ser feita uma análise comparativa entre a expressão do bFGF, FGFR2 e Ki-67 observou-se que a ligação do bFGF ao seu receptor FGFR2 pode favorecer a estimulação da proliferação celular, através de mecanismos de estimulação intrácrinos uma vez que este receptor está altamente expresso no núcleo das células da placenta bubalina ao longo da gestação. A expressão destas proteínas no

citoplasma das células da placenta sugere também a estimulação das vias autócrinas e parácrinas através da sua ligação com seus receptores.

Segundo a literatura a atividade proliferativa celular pode ser influenciada por outros FGFs: FGF4 (BACZYK et al., 2005; SUZUKI et al., 2001), FGF7 (PALMIERI et al., 2003), FGF8 (SUZUKI et al., 2001; XU et al., 1998), FGF9 (MIYAGI et al., 1999) e FGF10 (XU et al., 1998). Segundo Baczyk et al. (2005) o FGF4 estimula a manutenção da célula em seu estado proliferativo. Em estudos realizados por Suzuki et al. (2001), em testículos normais e tumorais, foi observado, através da marcação da atividade proliferativa a partir do Ki-67, intensa área mitogênica e alta expressão de FGF4, FGF8 e FGFR1. Esses dados estão de acordo com os resultados deste presente estudo, uma vez que o FGFR1 apresentou alta correlação positiva com o Ki-67 ($p < 0,0001$, para o epitélio materno e estroma materno, $p = 0,0068$ para o estroma fetal e $p = 0,118$, não significativa para o epitélio fetal).

Na placenta bubalina a modulação da proliferação celular parece não estar relacionada somente ao bFGF, mas sim à ação conjunta entre bFGF e outro FGF, que poderia ser o FGF4, o FGF8 ou mesmo o FGF10. O bFGF parece modular a atividade proliferativa do epitélio fetal através da ativação do FGFR2. Quando o FGFR1 é ativado, a ação parece estar sendo modulada por outro FGF que não o bFGF, uma vez que a correlação encontrada foi mais baixa ($p < 0.05$).

Muitos aspectos do processo reprodutivo ainda são desconhecidos e serão alvo de pesquisas futuras. São muitos os benefícios que podem advir da caracterização dos efeitos produzidos pelos fatores de crescimento, os quais podem ser utilizados com

a finalidade de otimizar o ambiente uterino e propiciar uma melhora dos índices reprodutivos de rebanhos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

1. as células do estroma fetal, epitélio fetal, epitélio materno e estroma materno expressam as proteínas do bFGF e seus receptores FGFR1 e FGFR2 na placenta bubalina aos 100, 150, 242 e 300 dias de gestação;
2. existe proliferação, marcada através da expressão do antígeno Ki-67, nas células do estroma fetal, epitélio fetal, epitélio materno e estroma materno da placenta bubalina ao longo da gestação;
3. existe uma correlação positiva entre a expressão das proteínas do bFGF e seus receptores, FGFR1 e FGFR2, e a expressão do Ki-67 ao longo da gestação; no entanto, o valor da correlação mostrou-se dependente do tipo celular e da fase de gestação analisados.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, D. S. Expression of p53 protein in actinic keratosis, adjacent, normal-appearing, and nonsun-exposed human skin. **Cancer Epidemiology and Biomarkers**, v. 6, n. 8, p. 583-587, 1997.
- ALLOUCHE, M.; BIKFALVI, A. The role of fibroblast growth factor – 2 in hematopoiesis. **Program of Growth Factor Research**, v. 6, p. 35-48, 1995.
- AMOROSO, E. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall's Physiology of Reproduction**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 127-311.
- ARANY, E.; HILL, D. J. Fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 mRNA expression and peptide localization in placenta from normal and diabetic pregnancies. **Placenta**, London, v. 19, n. 2-3, p. 133-142, 1998.
- ARESE, M.; CHEN, Y.; FLORKIEWICZ, R. Z.; GUALANDRIS, A.; SHEN, B.; RIFKIN, D. B. Nuclear activities of basic Fibroblast Growth Factor: Potential of Low-Serum Growth Mediated by Natural or Chimeric Nuclear Localization Signals. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 1429-1444, 1999.
- AUGUSTIN, H. G. Vascular morphogenesis in the ovary. **Bailliere's Clinical Obstretitian and Gynecology**, v. 14, p. 867-882, 2000.
- BACZYK, D.; DUNK, C.; HUPPERTZ, B.; MAXWELL, C.; REISTER, F.; GIANNOULIAS, D.; KINGDOM, J. C. Bi-potential behavior of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. **Placenta**, v. 9, article in press, 2005.
- BAIRD, A. Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors. **Current Opinion on NeuroBiology**, v. 4, p. 78-86, 1994.
- BAIRD, A.; BOHLEN, P. Fibroblast growth factors. IN: **Peptide Growth Factors and Their Receptor**. Berlín: Springer-Verlag, 1990, p. 369-418.
- BALDIN, V.; ROMAN, A. M.; BOSC-BIERNE, L.; AMALRIC, F.; BOUCHE, G. Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. **EMBO Journal**, v. 9, p. 1511-1517, 1990.
- BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv Cancer Res**, v. 59, p. 115-165, 1992.
- BASTAKI, M.; NELLI, E. E.; DELL'ERA, P.; RUSNATI, M.; MOLINARI-TOSATTI, M. P.; PAROLINI, S.; AUERBACH, R.; RUCO, L. P.; POSSATI, L.; PRESTA, M. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 17, n. 3, p. 454-464, 1997.

BERNARD, O.; LI, M.; REID, H. H. Expression of two different forms of fibroblast growth factor receptor 1 in different mouse tissues and cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 7625-7629, 1991.

BIKFALVI, A.; HAN, Z. C. Angiogenic growth factors are hematopoietic growth factors and *vice versa*. **Leukemia**, v. 8, p. 523-529, 1994.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 26-45, 1997

BJÖRKMAN, N. In: WILMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Textbook of Veterinary Histology**, Editora, Local, 1976. p. 351-369.

BJORKMAN, N. H. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta Anatomica**, v.22, p. 1-91, 1954.

BJORKMAN, N. H. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Records**, v. 163, n. 1, p. 17-29, 1969.

BLASIO, A. M.; CARNITINI, C. ; VIGANO, P.; FLORIO, P. PETRAGLIA, F.; VIGNALI, M. Basic fibroblast growth factor messenger ribonucleic acid levels in human placentas from normal and pathological pregnancies. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 12, p. 1119-1123, 1997.

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**, v. 126, p. 469-480, 2003.

BOUCHE, G.; GAS, N.; PRATS, H.; BALDIN, V.; TAUBER, J.; TEISSIE, J.; AMALRIC, F. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0-G1 transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 6770-6774, 1987.

BOYD, J. D.; HAMILTON, W. J. In: **The human placenta**, Editora, Cambridge, p. 520, 1970.

BRIGSTOCK, D. R. Growth factors in the uterus: steroidal regulation and biological actions. **Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 5, n.4, p. 791-808, 1991.

BURGESS, W. H.; MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 58, p. 575-606, 1989.

BURLEICH, D. W.; STEWART, K.; GRINDLE, K. M.; KAY, H. H.; GOLOS, T. G. Influence of maternal diabetes on placental fibroblast growth factor-2 expression, proliferation, and apoptosis. **Journal of the Society of Gynecological Investigation**, v. 11, n. 1, p. 36-41, 2004.

CATTINI, P. A.; NICKEL, B.; BOCK, M.; KARDAMI, E. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and growth-inhibited placental cells: a possible role for bFGF in placental cells development. **Placenta**, v. 12, p. 341-352, 1991.

- CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, 103-113, 2004.
- COLEMAN, A. B. Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 85-94, 2003.
- CAMPOS, D. B. **Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus recptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterone pelas células placentárias em cultura**. 2005. 193f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CONLEY, A. J.; MASON, J. I. Placental steroid hormones. **Baillieres Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 249-272, 1990.
- CORREIA-DA-SILVA, G.; BELL, S. C.; PRINGLE, J. H.; TEIXEIRA, N. A. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. **Placenta**, v. 25, p. 538-547, 2004.
- DANTZER, V. IN: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, p. 18-28, 1999.
- DARNEL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. Cell division and DNA replication. IN: DARNEL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular cell biology**, New York, 1986, p. 146-154.
- DAVIS, M. G.; ZHOU, M.; ALI, S.; COFFIN, J. D.; DOETSCHMAN, T.; DORN II, G. W. Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 29, n. 4, p. 1061-1072, 1997.
- DAY, A. M. Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 25, n. 6, p. 139-144, 1977.
- DENG, C. X.; WYNshaw-BORIS, A.; SHEN, M. M.; DAUGHERTY, C.; ORNITZ, D. M. Murine FGFR1 is required for early postimplantation growth and axial organization. **Genes & Development**, v. 8, p. 3045-3057, 1994.
- DE WITT, F. An historical study on theories of the placenta to 1900. **Journal of Histo Med**, v. 14, p. 360-374, 1958.
- DIONNE, C. A.; CRUMLEY, G.; BELLOT, F.; KAPLOW, J. M.; SEARFOSS, G.; RUTA, M.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; ACHLESSINGER, J. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acid and basic fibroblast growth factors. **EMBO Journal**, v. 9, p. 2685-2692, 1990.
- DOWD, C. J.; COONEY, M. A.; NUGENT, M. A. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 5236-5244, 1999.

- DUNK, C.; AHMED, A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. **Histology and Histopathology: cellular and molecular biology**. Murcia, v. 16, n. 2, p. 359-375, 2000.
- ENRIQUEZ-YAP, E. L. The placentome of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*), in the mid-pergnancy: a study to stablish the basis of clinico-pathological analisys on the possible causes of early reproductive failures. **The Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v. 13, p. 1-25, 1974.
- ESTERGREEN, V. L.; FROST, O. L.; GOMES, W. R.; ERB, R. E.; BULLARD, J. F. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 50, n. 8, p. 1293-1295, 1967.
- EVAIN-BRION, D.; MALASSINE, A. Human placenta as an endocrine organ. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 14, p. S34-S37, 2003.
- FALLON, J. F.; LOPEZ, A.; ROS, M. A.; SAVAGE, M. P. OLWIN, B. B.; SIMANDL, B. K. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. **Science**, v. 264, p. 104-107, 1994.
- FANTL, W. J.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Signalling by receptor tyrosine kinases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 62, p. 453-481, 1993.
- FENG, S.; XU, J.; WANG, F.; KAN, M.; MCKEEHAN, W. L. Nuclear localization of a complex of fibroblast growth factor(FGF)-1 and an NH2-terminal fragment of FGF receptor isoforms R4 and R1alpha in human liver cells. **Acta of Biochemistry and Biophysics**, v. 10, n. 1310(1), p. 67-73, 1996.
- FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine*, Berlin, v. 77, n. 7, p. 527-543, 1999.
- FERRELL, C. L.; Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues in the gravid uterus. **Journal of Animal Sciences**, v. 69, p. 1945, 1991.
- FERRIANI, R. A.; AHMED, A.; SHARKEY, A.; SMITH, S. K. Co-localization of acid and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. **Growth factors**, v. 10, p. 259-268, 1994.
- FERRIANI, R. A.; AHMED, A.; SHARKEY, A.; SMITH, S. K. Colocalization of acid and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. **Growth factors**, v. 10, p. 259-268, 1994.
- FISCHER, S.; DRAPER, B. W.; NEUMANN, C. J. The zebrafish fgf24 mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. **Development**, v. 130, p. 3515-3524, 2003.
- FLORKIEWICZ, R. Z.; SOMMER, A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 1836, 1840, 1989.

FOLKMAN, J. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Seminar of Cancer Biology**, v. 1, p. 99-206, 1990.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analyses of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 1710-1715, 1984.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, p. 13-20, 1983.

GERWINS, P.; SKÖLDENBERG, E.; CLAEISSON-WELSH, L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 34, p. 185-194, 2000.

GEVA, E.; GINZINGER, D. G.; ZALOUDEK, C. J.; MOORE, D. H.; BYRNE, A.; JAFFE, R. B. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor – A, angiopoietin-1 and angiopoietin-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4219-4224, 2002.

GILL, T. A.; WEGMANN, T. G. In: **Immunoregulation and Fetal Survival**. Oxford University Press, Inglaterra, 1987, p. 467.

GOL, M.; TUNA, B.; DOGAN, E.; GULEKLI, B.; BAGCI, M.; ALTUNYURT, S. SAYGILI, U. Does fetal gender affect cytotrophoblast cell activity in the human term placenta? Correlation with maternal hCG levels. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 83, p. 711-715, 2004.

GONZALEZ, A. M.; BERRY, M.; MAHER, P. A.; LOGAN, A.; BAIRD, A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. **Brain Research**, London, v. 701, n. 1-2, p. 201-226, 1995.

GOSPODAROWICZ, D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 2515-2510, 1975.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. **Endocrinology Reviews**, v. 8, p. 95-114, 1987.

GOSPODAROWICZ, D. Fibroblast growth factors: chemical structure and biological function. **Pediatric Research**, v. 58, p. 231-248, 1990.

GRAY, C. A.; JOHNSON, G. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311-1323, 2001.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Secretion of angiogenic activity and progesterone by ovine luteal cell types in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 5, p. 2099-2107, 1991.

GRITTI, A.; PARATI, E. A.; COVA, L.; FROLICHSTHAL, P.; GALLI, R.; WANKE, E.; FARAVELLI, L.; MORASSUTTI, D. J.; ROISEN, F.; NIKEL, D. D.; VESCOVI, A. L. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. **Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 16(3), p. 1091-1100, 1996.

GRUNDKER, C.; KIRCHNER, C. Uterine fibroblast growth factor-2 and embryonic fibroblast growth factor receptor-1 at the beginning of gastrulation in the rabbit. **Anatomy and Embryology**, v. 194, n. 2, p. 169-175, 1996.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, Springfield, v. 23, n. 1-2, p. 309-320, 2002.

HORI, A.; SASADA, R.; MATSUTANI, E.; NAITO, K.; SAKURA, Y.; FUJITA, T.; KOZAI, Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. **Cancer Research**, v. 15, n. 51 (22), p. 6180-6184, 1991.

HSIA, E.; RICHARDSON, T. P.; NUGENT, M. A. Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**, London, v. 88, n. 6, p. 1214-1225, 2003.

HUGHES, S. E. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1005-1019, 1997.

HOUSSAINT, E.; BLANQUET, P. R.; CHAMPION-ARNOUD, P. GESNEL, M. C.; TORRIGLIA, A.; COURTIOS, Y.; BRATHNACH, R. Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 8180-8184, 1990.

IATROPOULOS, M. J.; WILLIAMS, G. M. Proliferation markers. **Experimental Toxicology and Pathology**, v. 48, n. 2-3, p. 175-81, 1996.

ISOLA, J.; HELIN, H.; KALLIONIEMI, O. P. Immunoelectron microscopic localization of a proliferation associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. **Immunohistochemistry**, v. 22, p. 498-506, 1990.

JOHNSON, W. H.; MANNS, J. G.; ADAMS, W. M.; MAPLETOFT, R. J. Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v. 22, n. 9, p. 288-290, 1981.

- JOY, A.; MOFFETT, J.; NEARY, K.; MORDECHAI, E.; STACHOWIAK, E. K.; COONS, S.; RANKIN-SHAPIRO, J.; FLORKIEWICZ, R. Z.; STACHOWIAK, M. K. Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. **Oncogene**, Basinstoke, v. 14, n. 2, p. 171-183, 1997.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. IN: *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 171-197.
- KANDA, S.; LANDGREN, E.; LJUNGSTROM, M.; CLAESSION-WELSH, L. Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. **Cell Growth and Differentiation**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 383-395, 1996.
- KEEGAN, K.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T.; HAYMAN, M. J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1095-1099, 1991.
- KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell Cycle Regulation and Apoptosis. **Annuals Reviews of Physiology**, v. 60, p. 601-617, 1998.
- KLAGSBRUN, M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. **Current Opinion on Cellular Biology**, v. 2, n. 5, p. 857-863, 1990.
- KLAGSBRUN, M.; BAIRD, A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. **Cell**, v. 18, n. 67(2), p. 229-231, 1991.
- KLINT, P.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. **Front Bioscience**, v. 15, n. 4, p. D165-177, 1999.
- KORNBLUTH, S.; PAULSON, K. E.; HANAFUSA, H. Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. **Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 5541-5544, 1988.
- LALA, P. K.; CHATTERJEE, H. S.; KEARNS, M.; MONTGOMERY, B.; COLAVICENZO, V. Immunobiology of the fetalmaternal interface. **Immunological Reviews**, v. 75, p. 87-116, 1983.
- LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, n. 6, p. 289-296, 2001.
- LEE, P. L.; JOHNSON, D. E.; COUSENS, L. S.; FRIED, V. A.; WILLIAMS, L. T. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. **Science**, Washington, v. 245, n. 4913, p. 57-60, 1989.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.

- LOGAN, A.; FRAUTSCHY, A. S.; BAIRD, A. Basic fibroblast growth factor and central nervous system injury. **Annals of New York Academy Science USA**, v. 63, p. 474-476, 1991.
- LUDWIG, K. S. Zur feinstruktur der maternofetalen verbindung in placenton des schafes (Ovis aries. L.). **Experientia**, v. 18, p. 212-213, 1962.
- MACKAY, F.; ROTHE, J.; BLUETHMANN, H.; LOETSCHER, H.; LESSLAUER, W. Differential responses of fibroblasts from wild-type and TNF-R55-deficient mice to mouse and human TNF-alpha activation. **Journal of Immunology**, v.1, n. 153(11), p. 5274-5284, 1994.
- MAHER, P. A. Identification and characterization of a novel, intracellular isoforma of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). **Journal of Cellular Physiology**, v. 169, p. 380-390, 1996.
- MALASSINE, A.; FRENDON, J. L.; EVAIN-BRION, D. A. Comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 6, p. 531-539, 2003.
- MANSUKHANI, A.; MOSCATELLI, D.; TALARICO, D.; LEVYTSKA, V.; BASILICO, C. A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4378-4382, 1990.
- MASON, I. J. The ins and outs of fibroblast growth factor. **Cell**, v. 78, p. 547-552, 1994.
- McAVOY, J. M.; CHAMBERLAIN, G. C.; de LONGH, R. V.; RICHARDSON, N. A.; LOVICU, F. J. The role of fibroblast growth factor in eye lens development. **Annals of New York Science**, v. 638, p. 256-274, 1991.
- MIYAGI, N.; KATO, S.; TERASAKI, M.; AOKI, T.; SUGITA, Y.; YAMAGUCHI, M.; SHIGEMORI, M.; MORIMATSU, M. Fibroblast growth factor-9 (glia-activating factor) stimulates proliferation and production of glial fibrillary acidic protein in human gliomas either in the presence or in the absence of the endogenous growth factor expression. **Oncology Reports**, v. 6, n. 1, p. 87-92, 1999.
- MOHAMMADI, M.; SCHLESSINGER, J.; HUBBARD, S. R. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. **Cell**, v. 23, n. 86(4), p. 577-587, 1996.
- MORONO, E. P.; WASHBURN, A. L. ; GOFORTH, D. P.; WU, N. Evidence that both receptor and heparan sulfate proteoglycan-bound basic fibroblast growth factor are internalized by cultured immature Leydig cells. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 98, p. 81-90, 1993.
- MOSCATELLI, D. Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/K-fgf oncogene causes downregulation of the fibroblast growth factor receptor: reversal of morphological transformation and restoration of receptor number by suramin. **Journal of Cellular Biology**, v. 109, n. 5, p. 2519-2527, 1989.

MOSSMAN, H. M. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie Institute Contributions to Embryology**, v. 26, p. 129-246, 1937.

MOURA, C. E. B.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T. V.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.; PAPA, P. C. Microvascularization and capillary density of corpus luteum from superovulated and control buffalo cows. **Acta Microscópica**, v. 12, p. 83-84, 2003.

NAKAGAWA, Y.; FUJIMOTO, J.; TAMAYA, T. Placental growth by the estrogen-dependent angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor, throughout gestation. **Gynecology and Endocrinology**, v. 19, n. 5, p. 259-266, 2004.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor – 2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 115-120, 2000.

OKADA-BAN, M.; THIERY, J. P.; JOUANNEAU, J. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 263-267, 2000.

OLWIN, B. B.; RAPRAEGER, A. C. Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF and k-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. **Journal of Cell Biology**, v. 118, p. 631-639, 1992.

ORNITZ, D. M.; YAYON, A.; FLANAGAN, J. G.; SVAHN, C. M.; LEVI, E.; LEDER, P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. **Molecular Cell Biology**, v. 12, p. 240-247, 1992.

ORNITZ, D. M.; LEDER, P. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptor 1 and 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 16305-16311, 1992.

ORR-URTREGER, A.; GIVOL, D.; YAYON, A.; YARDEN, Y.; LONAI, P. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. **Development**, v. 113, n. 4, p. 1419-34, 1991.

ORR-URTREGER, A.; BEDFORD, M. T.; ARMAN, B. E.; ZIMMER, Y.; YAYON, A.; GIVOL, D.; LONAI, P. **Developmental Biology**, v. 158, p. 475-486, 1993.

PALMIERI, C.; ROBERTS-CLARK, D.; ASSADI-SABET, A.; COOPE, R. C.; O'HARE, M.; SUNTERS, A.; HANBY, A.; GOMM, J. J.; LAM, E. W. F.; COOMBES, R. C. Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1 β -induced paracrine growth factor for human breast cells. **Journal of Endocrinology**, v. 177, p. 65-81, 2003.

PATERNEN, J.; MAKELA, T. P.; EEROLA, E.; KORHONEN, J.; HIRVONEN, H.; CLAEISSON-WELSH, L.; ALITALO, K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 1347-1354, 1991.

- PASQUALE, E. B. A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, p. 5812-5816, 1990.
- PAWSON, T. Signal transduction in the control of cell growth and development. **Trends Genet**, v. 1, n. 7, p. 343-345, 1991.
- PETERS, K. G.; WERNER, S.; CHEN, G.; WILLIAMS, L. T. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. **Development**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 233-243, 1992.
- PFARRER, C.; BERISHA, B.; SCHULER, G.; SCHAMS, D.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Expression and localization of mRNA for fibroblast growth factor (FGF) family members and FGF-receptor (FGFR) mRNAs in bovine placentomes from early gestation until term. **Placenta**, London, v. 24, n. 8-9, p. A.29, 2003.
- PRADO, C.; GARBELOTTI, F.; ARTONI, L. P.; CAMPOS, D. B.; MOURA, C. E. B.; PFARRER, C.; PAPA, P. C. Imunolocalização do FGF2 em corpo lúteo de búfalos em diferentes estágios do ciclo estral. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 8, p. 39-41, 2004.
- PRATS, H.; KAGHAD, H.; PRATS, A. C.; KLAGSBRUN, M.; LELIAS, J. M.; LIAUZUN, P.; CHALON, P.; TAUBER, J. P.; AMALRIC, F.; SMITH, J. A.; CAPUT, D. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, 1836-1840, 1989.
- PRIOR, R. L.; LASTER, D. B. Development of the bovine fetus. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 1546, 1979.
- QUARTO, N.; TALARICO, D.; FLOKIEWICZ, R.; RIFKIN, D. B. Selective expression of high molecular weight basic fibroblast growth factor confers a unique phenotype to NIH3T3 cells. **Cell Regulation**, v. 2, p. 699-708, 1991.
- RAPRAEGER, A. C.; KRUFKA, A.; OLWIN, B. B. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. **Science**, v. 251, n. 5012, p. 1705-1708, 1991.
- RAPRAEGER, A. C.; GUIMOND, S.; KRUFKA, A.; OLWIN, B. B. Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling. **Methods Enzymol**, v. 240, p. 245-219, 1994.
- RATTNER, J. B. Integrating chromosome structure with function. **Chromosoma**, v. 101, n. 5-6, p. 259-264, 1992.
- RAZ, V.; KEIMAN, Z.; AVIVI, A.; NEUFELD, G.; GIVOL, D.; YARDEN, Y. PCR-based identification of new receptors: molecular cloning of a receptor for fibroblast growth factors. **Oncogene**, v. 6, p. 753-760, 1991.
- REID, H. H.; WILKS, A. F.; BERNARD, O. Two forms of the basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 1596-1600, 1990.

- RENKO, M.; QUARTO, N.; MORIMOTO, T.; RIFKIN, D. B. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 144, n. 1, p. 108-114, 1990.
- Reynolds, L. P.; Redner, D. A. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*, Champaign, v. 64, n. 4 p. 1033-1040, 2001.
- REYNOLDS, L. P.; BECKMAN, J. D.; KIRSH, J. D.; KRAFT, K. C.; REDMER, D. A. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in ovine uterine and placental tissues of late pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 60, supp. 1, p. 217, 1999.
- REYNOLDS, L. P.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB**, v. 6, p. 886, 1992.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-Placental vascular development and placental functions. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1839-1851, 1995.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 4, p. 1033-1040, 2001.
- RIDER, V.; PIVA, M. Role of growth factors of uterine and fetal-placental origin during pregnancy. IN: BAZER, F. W. **The endocrinology of pregnancy**. 1998 Totowa, Humana Press, p. 83-124.
- RIFKIN, D. B.; MOSCATELLI, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. **Journal of Cell Biology**, v. 109, p. 1-6, 1989.
- RILEY, B. B.; SAVAGE, M. P.; SIMANDL, B. K.; OLWIN, B. B.; FALLON, J. F. Retroviral expression of FGF-2 (bFGF) affects patterning in chick limb bud. **Development**, v. 118, p. 95-104, 1993.
- ROGHANI, M.; MOSCATELLI, D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 22156-22162, 1992.
- ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The function of uterine secretions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 875-892, 1988.
- RUSNATI, M.; URBINATI, C.; PRESTA, M. Internalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultures endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 154, p. 152-161, 1993.
- RUTA, M.; BURGESS, W.; EPSTEIN, J.; NEIGER, N.; KAPLOW, J.; CRUMLEY, G.; DIONNE, C.; JAYE, M. SCHLESSINGER, J. Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the *fms*-like gene (FLG). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 8722-8726, 1989.

SCHULER, M.; BOSSY-WETZEL, E.; GOLDSTEIN, J. C.; FITZGERALD, P.; GREEN, D. R. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry*, 10, n. 275, p. 7337-7342, 2000.

SCHWARTZMAN, R. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrinology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 133-51, 1993.

SCHWARTZ, S. M.; LIAW, L. Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 21, p. S31-S39, 1993.

SHAMS, M.; AHMED, A. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. **Growth Factors**, v. 11, p. 105-111, 1994.

SHEMESH, M.; HANSEL, W.; STRAUSS III, J. F. Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 20, p. 6403-6407, 1984.

SLEEMAN, M.; FRASER, J.; MCDONALD, M.; YUAN, S.; WHITE, D.; GRANDISON, P.; KUMBLE, K.; WATSON, J. D.; MURISON, J. G. Identification of a new Fibroblast growth factor receptor, FGFR5. **Gene**, v. 271, p. 171-182, 2001.

SOLOMON, R. Reproductive rights and wrongs. **Health Millions**, v. 2, n. 3, p. 26-27, 1994.

SPECTOR, D. L. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annual Reviews on Cellular Biology*, v.9, p. 265-315, 1993.

SPERINDLE, G. V.; NUGENT, M. A. Heparan sulfate proteoglycans control bFGF processing in vascular smooth muscle cells. **Biochemistry**, v. 37, p. 13153-13164, 1998.

STACHOWIAK, E. K.; MAHER, P. A.; TUCHOLSKI, J.; MORDECHAI, E.; JOY, A.; MOFFETT, J.; COONS, S.; STACHOWIAK, M. K. Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. **Oncogene**, Basinstoke, v. 14, n. 18, p. 2201-2211, 1997.

STARBORG, M.; GELL, K.; BRUNDELL, E.; HÖÖG, C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 143-153, 1996.

STAUBER, D. J.; DIGABRIELE, A. D.; HENDRICKSON, W. A. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. **Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 49-54, 2000.

SUZUKI, K.; TOKUE, A.; KAMIAKITO, T.; KURIKI, K.; SAITO, K.; TANAKA, A. Predominant expression of fibroblast growth factor (FGF) 8, FGF4, and FGF receptor 1 in nonseminomatous and highly proliferative components of testicular germ cell tumors. **Virchow Arch**, v. 439, n. 5, p. 616-621, 2001.

THOMAS, K. A. Fibroblast growth factors. **FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 434-40, 1987.

TORRY, D. S.; HINRICHS, M.; TORRY, R. J. Determinants of placental vascularity. *American Journal of Reproduction and Immunology*, v. 51, n. 4, p. 257-68, 2004.

UNSICKER, K.; ENGELS, S.; HAMM, C.; LUDECKE, G.; MEIER, C.; RENZING, J.; TERBRACK, H. G.; FLANDERS, K. Molecular control of neuralplasticity by the multifunctional growth factors families of the FGFs and TGF- β . **Anat Anz**, v. 174, p. 405-407, 1992.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN-BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. *Cellular Proliferation*, v. 36, n. 3, p. 165-75, 2003.

VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H. J.; SCHLINGEMANN, R. O.; BOEHMER, A. L.; VAN-DRIEL, R.; BRAKENHOFF, G. J.; RAMAEKERS, F. C. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. **Journal of Cellular Sciences**, v. 92, p. 123-30, 1989a.

VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H. J.; VAN-DRIEL, R.; BECK, J. L.; VAN-DIERENDONCK, J. H.; BRAKENHOFF, G. J.; RAMAEKERS, F. C. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *Journal of Cellular Sciences*, v.92, p. 531-40, 1989b.

XU, X.; WEINSTEIN, M.; LI, C.; NASKI, M.; COHEN, R. I.; ORNITZ, D. M.; LEDER, P.; DENG, C. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)- mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. **Development**, v. 125, p. 753-765, 1998.

YAMAGUCHI, T. P.; HARPAL, K. ; MARK, H.; ROSSANT, J. fgfr1 is required for embrionic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. **Genes & Development**, v. 8, p. 3032-3044, 1994.

YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J. D.; LEDER, P. ORNITZ, D. M. Cell surface heparin like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**, v. 64, p. 841-848, 1991.

YU, Z. X.; SADATOSHI, B.; FU, Y. M.; SÁNCHEZ, G. S.; SASSE, J.; FERRANS, V.J.; CASSCELLS, W. Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endotelials cells: immunohistochemical and biochemical studies. **Experimental Cell Research**, v. 204, p. 247-259, 1993.

YU, C. C.; WOODS, A. L.; LEVISON, D. A. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. **Histochemistry Journal**, v. 24, n. 3, p. 121-31, 1992.

WEI, P.; YU, F. Q.; CHEN, X. L.; TAO, S. X.; HAN, C. S.; LIU, Y. X. VEGF, bFGF and their receptors at the fetal-maternal interface of the rhesus monkey. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, p. 184-196, 2004.

WEISE, E. Spread of zoonotic agents by foods of animal origin. *Deutscher Tierarztl Wochenscher*, v. 108, n. 8, p. 344-72001.

WELSH, A.O.; ENDERS, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidua cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. **American Journal of Anatomy**, v. 172, n. 1, p. 1-29, 1985.

WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Chorioallantoic placenta formation in the rat: I. Luminal epithelial cell death and extracellular matrix modifications in the mesometrial region of implantation chambers. **American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 4, p. 215-231, 1991.

WELTER, H.; WOLLENHAUPT, K.; EINSPANIER, R. Developmental and hormonal regulated gene expression of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and its receptors in angiogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 34, p. 185-194, 2000.

WIEDLOCHA, A.; FALNES, P. O.; RAPAK, A.; MUNOZ, R.; KLINGENBERG, O.; OLSNES, S. Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. **Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 270-280, 1994.

WIRTH, C. Immunhistologische Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Charakterisierung der Zelldynamik in den Plazentomen des Rindes in der zweiten Hälfte der Gravidität und unter Geburt. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia da Reprodução) – FU Berlin, Giessen, 2001.

WOODING, F. B. P. Current Topic: The Synepitheliochorial Placenta of Ruminants: Binucleate Cell Fusions and Hormone Production. **Placenta**, v. 13, p. 101-113, 1992.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. In: LAMMING, G. E. **Marshall's Physiology of Reproduction**, 4 ed, Chapman & Hall, Inglaterra, p. 235-460, 1994.

ZHENG, J.; VAGNONI, K. E.; BIRD, I. M.; MAGNESS, R. R. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II Type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1189-1197, 1997.

ZHENG, J.; MAGNESS R. R.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenic activity of ovine placental tissues: Immunoneutralization with FGF2 and VEGF antisera. **Journal of Gynecology Investigation**, v. 2, p. 289, 1995.

ZHENG, J.; VAGNONI, K. E.; BIRD, I. M.; MAGNESS, R. R. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.56, n. 5, p.1189-97, 1998.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; UWE, L.; LIANG, O. D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, p. S10-S18, 2003.

Apêndices

APÊNDICES

1 Solução citrato 10mM

Solução A: 21,01 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Ecibra Reagentes Analíticos) em 1000 ml de água ultrapura.

Solução B: 29,41 g de citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) (Ecibra Reagentes Analíticos) em 1000 ml de água ultrapura.

A solução citrato foi preparada adicionando-se 18 ml da solução A e 82 ml da solução B em 1000 ml de água ultrapura, pH 6,0.

2 Solução tampão fosfato (PBS)

Os reagentes utilizados (Quadro 1) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2 (solução cinco vezes concentrada).

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	41,0 g
Fosfato de sódio dibásico dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	11,0 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	2,75 g

Quadro 1 - Formulação da solução tampão fosfato. São Paulo, 2005

3 Tratamento com 3-aminopropiltietroxi-silano

Lâminas para histologia devem ser limpas com álcool etílico absoluto e imersas em uma solução contendo 3-aminopropiltietroxi-silano (APES) (Sigma Chemical Co.,

Estados Unidos) em acetona (Labsinth Produtos para Laboratório Ltda, Brasil) por um minuto e imediatamente imersas em acetona, dois banhos 20 segundos e 2 banhos rápidos em água destilada.

4 Análise estatística

Foram selecionados cinco campos de cada corte submetidos ao teste de imunohistoquímica para o bFGF, FGFR1, FGFR2 e Ki-67. Cada lâmina continha três cortes testes e um teste controle.

A avaliação da expressão foi feita separadamente para o estroma materno, epitélio materno, epitélio fetal e estroma fetal, seguindo um mesmo critério de avaliação:

Reação ausente (1), fraca (2), moderada (3) e forte (4).

Os dados foram analisados com o auxílio do programa Graph Prism 4.0.

A partir dos resultados obtidos foram construídos os gráficos que comparam a expressão do bFGF, FGFR1 e FGFR2 com a expressão do antígeno Ki-67.