Rebanho de búfalos leiteiros, FMVZ-USP, *campus* de Pirassununga, SP

Bubalus bubalis bubalis

MARIA ZILAH BENETONE

Apoptose e proliferação na placenta de búfalas

São Paulo

2005

MARIA ZILAH BENETONE

Apoptose e proliferação na placenta de búfalas

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:

Prof^a Dr^a Maria Angélica Miglino

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1616
FMVZ

Benetone, Maria Zilah
Apoptose e proliferação na placenta de búfalas / Maria Zilah
Benetone. -- São Paulo : M. Z. Benetone, 2005.
186 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. Maria Angélica Miglino.

1. Apoptose. 2. Placenta. 3. Búfalo. 4. Caspase.
5. Proliferação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Maria Zilah Benetone

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 810/2005, intitulado: "Apoptose e proliferação na placenta de búfalas", no qual foram utilizados 42 (quarenta e dois) búfalos (peças de matadouro), sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 25 de novembro de 2005

Prof. Dra. Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BENETONE, Maria Zilah

Título: Apoptose e proliferação na placenta de búfalas

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: _____

**“Pois que aproveitaria ao homem ganhar todo o mundo e perder a sua alma?”-
Jesus.**

(MARCOS, 8:36)

À Deus, Senhor de todas as coisas.

Salmo 91

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

Porque ele te livrará do laço do passarinho e da peste perniciosa.

Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas estarás seguro; a sua verdade é escudo e broquel.

Não temerás espanto noturno, nem seta que voe de dia,

Nem peste que ande na escuridão, nem mortandade que assole ao meio-dia.

Mil cairão ao teu lado, e dez mil, à tua direita, mas tu não serás atingido.

Somente com os teus olhos olharás e verás a recompensa dos ímpios,

Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio! O Altíssimo é a tua habitação.

Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.

Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.

Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.

Pisarás o leão e a áspide; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.

Pois que tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei num alto retiro, porque conheceu o meu nome.

Ele me invocará e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; livrá-lo-ei e o glorificarei.

Dar-lhe-ei abundância de dias e lhe mostrarei a minha salvação.”

Aos amigos do Plano Maior, obrigada de todo o coração por sustentarem a mim e à minha fé.

“Não te furtas a transmitir os dons do Evangelho.
Se caíste, levanta-te e estende as mãos, construindo o melhor.
Se estiveste em erro até ontem, reconsidera o gesto impensado e ajuda aos semelhantes.
Se doente, permanece na confiança, encorajando e esclarecendo a quem te ouve a palavra.
Se cansado, recompõe as próprias forças na fé, e prossegue amparando sempre.
Caluniado, perdoa e esquece o golpe, procurando servir.
Menosprezado, não firas ninguém e esforça-te por ser útil.
Perseguido, esquece o mal e faz o bem que possas.
Insultado, olvida toda ofensa e auxilia sem mágoa.
Em meio de todas as fraquezas e vicissitudes que nos rodeiam a alma, estejamos convictos de que possuímos o conhecimento da verdade e a flama do amor, como quem transporta um tesouro em vasos de barro, para que a excelência da virtude resplandeça por luz de Deus e não nossa.”

Francisco Cândido Xavier, pelo espírito de Emmanuel

Aos meus pais, Victor da Silva Benetone e Nazareth Duarte Benetone, meus maiores exemplos de honestidade, respeito e retidão de caráter, aos quais eu devo tudo o que sou de melhor e todas as minhas conquistas. Obrigada ainda pela dedicação e cuidados redobrados dispensados à Anna, durante todo este longo período. A vocês, todo o meu amor e gratidão eternos.

Ao meu companheiro Evandro Augusto Munhoz Machado, que segurou minhas mãos nos piores e melhores momentos, com amor, carinho, paciência, dedicação, e fidelidade absolutos. Obrigada por sua imensa generosidade, oferecendo-me toda a ajuda financeira, indispensável para que eu cumprisse esta jornada até o fim, além de ter auxiliado em diversas etapas deste trabalho. Amo você.

À minha filha Anna Benetone Machado, o maior presente que a vida me concedeu. Que eu possa ser para você um incentivo a nunca desistir dos seus planos, por maiores sejam as dificuldades. Acredite sempre em Deus; somente Ele tem o poder sobre os homens, e será sempre conforme a Sua vontade.

À minha querida professora e amiga Maria das Graças Prianti, pela sua paciência, constância e profissionalismo, conciliando seus inúmeros afazeres por meses a fio com a padronização e o aprimoramento das reações de imunoistoquímica, colaboração esta fundamental para a conclusão deste projeto. Muito obrigada pelas inúmeras vezes em que, mediante minhas dúvidas e dificuldades, esteve ao meu lado ensinando, explicando, realizando junto comigo. Além dos ensinamentos, ofereceu-me apoio fraterno durante todo este longo período, o que demonstra de sua parte muito mais do que dedicação ao aluno, mas antes uma preocupação genuína com o ser humano.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino, pela valiosa oportunidade concedida, confiando-me o desenvolvimento de um de seus projetos, pela sua paciência, por seu exemplo de empreendedorismo e pela plena disponibilização dos recursos do laboratório de Histologia de seu Departamento.

À Prof^a. Dr^a. Hiro Goto, por ter me recebido em seu laboratório como se fosse eu integrante de sua equipe, auxiliando efetivamente na concretização deste trabalho, cedendo reagentes, anticorpos e todo o material necessário, oferecendo sugestões e contribuindo com sua experiência, sempre com muito respeito e cordialidade. Obrigada pela confiança e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli, que esteve presente desde o início, contribuindo desde o delineamento experimental até as últimas etapas de imunistoquímica e documentação fotográfica, oferecendo-me generosamente os recursos financeiros e humanos de seu laboratório. Obrigada por sua dedicação e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Arani Nanci Bonfim Mariana por ter me aceitado como sua orientada, ainda que *pro tempore*, e ter sempre acompanhado de perto a parte experimental e o desenvolvimento da pesquisa, com muito interesse e boa vontade, próprios de sua pessoa.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blasquez por ter cedido seu laboratório, instrumentos e materiais sempre que solicitados. Agradeço muitíssimo todas as vezes em que bati à sua porta em busca de soluções e fui extremamente bem recebida e atendida pronta e plenamente.

Ao Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso por ter-nos cedido de maneira tão generosa anticorpos para o nosso experimento.

Ao Prof. Dr. José Manoel dos Santos, por ter avaliado cuidadosamente todo o material, definindo o que seria destinado à imunistoquímica, por suas explicações valiosas e muito didáticas, por sua amizade, e pela sua disponibilidade, apesar dos muitos compromissos.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pela gentileza de me receber em seu laboratório e pelo direcionamento que deu ao nosso projeto, avaliando nossos resultados preliminares e determinando, com enorme responsabilidade, anticorpos a serem utilizados durante o experimento.

Ao Prof. Dr. José Luiz Guerra, grande amigo e exemplo profissional desde a graduação, um ser humano excepcional que inúmeras vezes me aconselhou e apontou o caminho. Por seu intermédio aprendi a gostar da pesquisa universitária e conheci vários profissionais de renome, alguns dos quais supra citados. Obrigada pelos ensinamentos, pela honra de ter sua amizade sincera e por ter acreditado em minha honestidade e força de trabalho sempre.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Flávia Thomaz Verechia Pereira e Ana Flávia de Carvalho, por terem cedido gentilmente seu material de pesquisa de mestrado e doutorado, respectivamente, como também anotações pessoais e referências bibliográficas.

Ao Prof. Dr. Douglas Antônio Zago e à Prof^a. Dr^a. Estela Bevilacqua pelas explicações histo-morfológicas. Conhecê-los foi uma enorme satisfação.

À Prof^a. Dr^a. Tatiana Carlesso dos Santos, pelas muitas vezes em que me ajudou, sempre com muita disposição e boa vontade, resolvendo problemas burocráticos, como também discutindo resultados preliminares.

Ao Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, por ter me convidado gentilmente a participar do programa de pós-graduação da Anatomia, sem quaisquer restrições.

À Prof^a. Dr^a. Irvênia Luiza de Santis Prada, por ter me ouvido quando precisei, por ter me amparado num momento de medo e incertezas, por ter me mostrado que sempre há um caminho. Obrigada por compartilhar sua luz.

À Prof^a. Dr^a. Júlia Maria Matera, por demonstrar preocupação com a condução das nossas pesquisas de uma forma ética e responsável e com as dificuldades dos pós-graduandos, procurando sempre fazer o melhor em sua área de atuação e lutando para que seu exemplo seja seguido. Obrigada pelo seu apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior pelos ensinamentos, sugestões e por sempre ter permitido meu livre acesso ao seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro e à Prof^a Dr^a Paula de Carvalho Pappa pelas dúvidas sanadas durante o programa; obrigada por sua atenção.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Costa pelas valiosas explicações e sugestões.

Ao Prof. Dr. Eduardo Farias pelos sábios conselhos.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis, amigo de longa data, que me incentivou a recomeçar e a não desistir, confiando mais em mim mesma e menos na opinião alheia.

À amiga Solange Cristina da Paixão, minha irmã do coração, por me ouvir e estar sempre de braços abertos, na alegria e na tristeza.

À toda a família e amigos do meu marido, pela compreensão que tiveram frente à nossa ausência em uma série de eventos comemorativos.

Aos queridos amigos e vizinhos Roseli Tadeu de Souza Cruz e seu filho Kleber, por terem cuidado de minha filha com amor e carinho, nas muitas vezes em que eu e minha mãe estivemos impossibilitadas. Obrigada pela amizade fraterna.

À todas as amigas da minha mãe que torceram junto com ela pelo meu bom desempenho.

Ao amigo Carlos Enrique Maggio, pela enorme paciência e bom humor, nas inúmeras ocasiões em que “monopolizei” sua esposa (Prianti).

Aos amigos de sempre Maria José Reis França, Maria José Sanseverino, Marina Viegas Neves Sathler da Silva, Giórgia Limnius, Liége Monteiro da Silva, Cristiane Mendes Vieira, Fabíola Ludovici, Érica Elias Baron, Ana Luisa Novato, Ana Célia Marques, Nicolas Kassalias, Zenaide Borges da Cunha, Peter e Paula

Hilgeland, Zilner Callera, Margareth Lima dos Santos, Luciana Ramos e Gilda Mattar, pelo carinho, pelo incentivo constante e pela torcida.

A todos os meus caros colegas de graduação da FFLCH-USP, pelo apoio e palavras encorajadoras.

Aos amigos da pós-graduação:

Gisele Saviani, uma pessoa maravilhosa, alegre, que realmente se preocupa como os amigos, obrigada pelo apoio do início ao fim;

Vanessa Belentani Marques, muito companheira, de uma vibração positiva intensa;

Roselaine Ponso de Oliveira, Halley Silva de Carvalho, Édson José Benetti, Procássia Lacerda, verdadeiros amigos de todas as horas;

Mariana Matera Veras, pela companhia constante e pelo muito que me ajudou nas técnicas laboratoriais de histologia; em meio a tudo nós ainda conseguíamos nos divertir bastante;

Janaína Munuera Monteiro e Lilian de Jesus Oliveira, sempre disponíveis para trocar idéias e para ensinar, imbuídas de boa vontade e carinho; muito obrigada à Janaína, sobretudo pela força na reta final;

Karina Martinez Gagliardo, pela vontade de auxiliar sempre, de coração aberto;

Karina do Valle Marques, uma grande pessoa, parceira nas aulas e nas dificuldades, obrigada por tudo;

Carlos Eduardo Bezerra de Moura e Rafael Cardoso Carvalho, profissionais extraordinariamente capazes, aprendi muito com vocês;

Henrique de Resende e Luciano Alonso, por dividirem amavelmente seus muitos conhecimentos nas aulas práticas;

Rosane Guimarães da Silva, Lucas Alécio Gomes, Wilker Gléria de Oliveira, Monica Zandoná Meleiro, David Iturrizaga, Angélica Paula Grando, Katia Viegas, Arlei José Birck, Adriana Rodrigues Ribeiro, Ryan Piera, Rosemary Bosch, Patrícia Carneiro, Maria Angélica Peres, Danila Campos, Fernanda Agreste, e a todos os demais colegas, pela amizade e convivência extremamente agradável.

À toda a equipe do laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia desta faculdade, por todo o auxílio a mim dispensado e muito particularmente à Tereza Cristina da Silva e Viviane Neri de Souza Reis , por acompanharem este projeto, ensinando com muita competência, paciência e dedicação, além do carinho com que sempre me receberam.

À equipe do laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pela acolhida fraterna, por tudo que me ensinaram, pelos bons momentos que passamos juntos; adoro vocês: Beatriz Julieta Celeste, Edna Barbosa de Souza, Mariko Yokoo, Edite Kanashiro, Eduardo Ramos, Fabrício Petitto, Flávia Freitas, Alexandre Taneno Kioshi, Marcel Murakami, Márcia Dias Carvalho, Mussya Rocha e Érika Manuli.

Ao técnico da Dermatologia do IMT-USP, Cleiton Alves, pela simpatia e pelas inúmeras contribuições.

Aos funcionários Ednaldo Ribas Farias (Índio), Ronaldo Agostinho e Diogo Nader Palermo, por estarem sempre dispostos a ajudar, descontraída e amigavelmente.

Aos técnicos do Departamento de Patologia, Cláudio Arroyo, Luciano Antas Bugalho e Marguiti Isaura Soares, por toda a ajuda durante o experimento e pela sua preciosa amizade.

À Secretaria do Departamento de Anatomia, especialmente à querida Jaqueline Martins de Santana, sempre bondosa, atenciosa e solícita.

À Secretaria do Departamento de Patologia, em particular à amiga Cláudia Ferreira de Faria.

À Secretaria de Pós-graduação desta faculdade.

Aos funcionários da Biblioteca desta faculdade, que compõem uma equipe maravilhosa, em especial às queridas amigas Rosa Maria Fischel Zani, Elena Tanganini, Elza Maria Faquim e Maria Fátima dos Santos.

À minha cachorra e amiga Violeta, que participou amistosamente em várias aulas práticas junto aos alunos da graduação.

À búfala Danúbia, que pertenceu ao rebanho da FMVZ-USP, *campus* de Pirassununga, em 1990, e posou para a foto.

A todos os animais que, involuntariamente, cederam seus órgãos para nossa pesquisa. Que os homens da ciência sejam capazes de valorizar esta nobre doação.

A todos que, mesmo indiretamente, tenham colaborado para o bom andamento do nosso trabalho.

RESUMO

BENETONE, M. Z. **Apoptose e proliferação na placenta de búfalas**. [Apoptosis and proliferation in the buffalo placenta]. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A apoptose é um processo fisiológico que desempenha papel crucial no desenvolvimento, remodelagem e senescência teciduais, inclusive placentários. A placenta, enquanto órgão temporário, atravessa todas estas fases em aproximadamente 10 meses, na espécie bubalina. O crescimento da placenta e a nutrição fetal requerem altas taxas de renovação e diferenciação celulares, e a maturação placentária está relacionada à redução das células epiteliais das criptas carunculares maternas. As modificações morfológicas celulares decorrentes do processo de apoptose são fruto de eventos bioquímicos complexos promovidos por uma família de cisteína-proteases, as caspases, especialmente as caspases executoras, dentre as quais se destaca a caspase-3, capaz de degradar várias proteínas citoplasmáticas e nucleares. Durante a apoptose, ocorre a clivagem caspase-mediada da citoqueratina 18, proteína dos filamentos intermediários do citoesqueleto, e com isso a formação de um neoepítipo específico. Por meio de métodos imunoistoquímicos pode-se detectar a presença tanto deste neoepítipo, quanto da forma ativa da caspase-3, o que demonstra que a célula entrou em estágio irreversível de morte celular. Morfologicamente, algumas das principais alterações celulares observadas são condensação da cromatina, a degradação e fragmentação do DNA, a formação de “blebs” (pregas/bolhas) na membrana plasmática, além da fragmentação celular em corpúsculos apoptóticos, os quais podem ser identificados em cortes corados pelo método de rotina hematoxilina e

eosina, utilizando-se microscópio de imunofluorescência, devido à eosinofluorescência das células em apoptose. Assim como a apoptose, a proliferação celular participa no equilíbrio homeostático tissular. Neste estudo, pretende-se avaliar a ocorrência de apoptose e proliferação celular em 42 placentônios de diferentes animais em diversas fases gestacionais (2-10 meses de gestação), em tecidos fixados em 4% paraformaldeído, incluídos em paraplast e submetidos à imunoistoquímica (anticorpo monoclonal M30 CytoDeath; Caspase-3 Clivada; PCNA - antígeno de marcação nuclear), sendo também avaliada a presença de corpúsculos apoptóticos eosinofluorescentes nas amostras. Utilizando-se M30 e caspase-3 clivada pudemos constatar a ocorrência de apoptose nos epitélios uterino e trofoblástico, em células gigantes placentárias e, ocasionalmente, em células mesenquimais fetais, do estroma uterino e endoteliais. Não houve diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os métodos adotados, mas sim entre os estágios gestacionais. Para o M30, houve um aumento significativo da apoptose do primeiro grupo (2-4.5 meses) em relação ao quarto grupo (9-10 meses); no caso da Caspase-3 Clivada houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0.05$) entre os três primeiros grupos (2-4.5; 5-6.5; e 7-8.5 meses de gestação, respectivamente) de animais em relação ao quarto grupo. Para o PCNA, ocorreu uma diminuição no número de células em proliferação dos dois primeiros grupos de animais em relação ao quarto grupo ($p < 0.05$). A presença de corpúsculos apoptóticos eosinofluorescentes pôde ser observada em todas as amostras. Nossos resultados sugerem haver uma relação entre a ocorrência de apoptose e a maturação, senescência e liberação placentárias em ruminantes.

Palavras-chave: Apoptose. Placenta. Búfalo. Caspase-3. Proliferação.

ABSTRACT

BENETONE, M. Z. **Apoptosis and proliferation in the buffalo placenta** [Apoptose e proliferação na placenta de búfalas].2005. x 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Apoptosis is a physiological process that plays a crucial role in the development, remodeling and aging of the placenta. The placenta is a temporary organ that undergoes growth and development, followed by senescence and death in 10 months in the buffalo species. Placental growth and fetal nutrition require high rates of cellular turnover and differentiation, and placental maturation is correlated to the reduction of the number of epithelial cells of the maternal crypts. The morphological changes of the apoptotic cells are product of complex variety of biochemical events promoted by a family of cystein-proteases, the caspases, mainly the effectors caspases, and among them the caspase-3, which is able to degrade cytoplasmic and nuclear proteins. During apoptosis, the caspase-mediated cleavage of cytokeratin 18, which is one of the first intermediate filament proteins of the cytoskeleton, leads to the formation of a specific neo-epitope. It is possible to detect the presence of this neo-epitope by immunohistochemistry, as well as the active form of caspase-3, showing that the cell has entered an irreversible stage of cell death. Morphologically, some of the main observed cellular alterations are condensation of the chromatin, degradation and spalling of the DNA, blebbing of the cell membrane and the formation of apoptotic bodies. These bodies can be identified in slides stained by hematoxilin and eosin with a fluorescent microscope, due to the eosinofluorescent property of the apoptotic cells. Like apoptosis, cellular proliferation also contributes to the tissue homeostasis. In the present study, we intend to

evaluate the occurrence of apoptosis and cellular proliferation in 42 placentomes, collected from different animals in several gestacional phases (2-10 months of gestation), fixed in 4% paraformaldehyde, processed for embedding in paraplast and cut in sections, through immunohistochemistry (monoclonal antibody M30 CytoDeath; Cleaved Caspase-3; PCNA - antigen of nuclear proliferation). The presence of eosinofluorescent apoptotic bodies were also studied in the samples. M30 and Cleaved Caspase-3 allowed to show the occurrence of apoptosis in the uterine and trophoblastic ephiteliuim, in placental giant cells and, occasionally, in the fetal mesenquimal cells, in the uterine stroma and endothelium cells. There were no significant differences ($p<0.05$) between the adopted methods, although there were differences between the gestational phases studied. For M30, there was an increase of the number of apoptotic cells ($p<0.05$) from the first group (2-4.5 months) in relation to the fourth group of animals (9-10 months); for the Cleaved Caspase-3 there was a statistical significant increase ($p<0.05$) between the first three groups of animals (2-4.5; 5-6.5; and 7-8.5 months of gestation, respectively) and the last one. In relation to the PCNA, a decrease in the number of proliferative cells occurred from the first two groups of animals to the fourth group ($p<0.05$). The occurrence of eosinofluorescent apoptotic bodies was observed in all the samples studied . Our data suggest a relationship between apoptosis and the maturation, senescence and release of the ruminant placenta.

Key Words: Apoptosis. Placenta. Buffalo. Caspase 3. Proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da placenta cotiledonária bovina.	46
Figura 2 - Placentônio de vaca no ultimo mês de gestação.	47
Figura 3 - Placentônio da vaca (Giessen; Extraído de RICHTER; GÖETZE, 1978)	52
Figura 4 - Placentônio de placenta bovina a termo com artérias umbilicais injetadas com látex-Neoprene colorido.	52
Figura 5 - Vias apoptóticas.....	84
Figura 6 - Representação esquemática da cascata apoptótica.....	98
Figura 7 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 1º grupo de animais. Observar os seguintes detalhes.....	128
Figura 8 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 2º grupo de animais	130
Figura 9 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 3º grupo de animais	132
Figura 10 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 4º grupo de animais	134
Figura 11 - Fotomicrografia mostrando os controles negativos de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala nos diversos grupos estudados., sendo	135
Figura 12 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 1º grupo de animais	138
Figura 13 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 2º grupo de animais	140
Figura 14 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 3º grupo de animais	142
Figura 15 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 4º grupo de animais	144
Figura 16 - Fotomicrografias mostrando controles negativos de M30 em placenta de búfalas, para diferentes grupos de animais.....	145

Figura 17 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 1º grupo de animais	148
Figura 18 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 2º grupo de animais	150
Figura 19 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 3º grupo de animais	152
Figura 20 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 4º grupo de animais. Destaques para.....	154
Figura 21 - Fotomicrografia mostrando os controles negativos de PCNA em placenta de búfala nos diversos grupos estudados	155
Figura 22 - Fotomicrografias mostrando correspondência entre células com morfologia sugestiva de apoptose, apresentando-se eosinofluorescentes (A-D), e a coloração verde citoplasmática fluorescente (A2-D2), nos diversos grupos de animais estudados. Corpúsculos apoptóticos (setas) podem ser facilmente identificados ...	158

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise semi-quantitativa da expressão de Caspase 3 clivada	136
Gráfico 2 - Análise semi-quantitativa da expressão de M30.....	146
Gráfico 3 - Análise semi-quantitativa da expressão de PCNA.....	156

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO DE LITERATURA	32
3.1 O BÚFALO	32
3.2 PLACENTA E PLACENTAÇÃO	34
3.2.1 Implantação	34
3.2.2 Placenta.....	41
3.3 FATORES RELACIONADOS A RETENÇÃO PLACENTÁRIA	67
3.4 APOPTOSE.....	69
3.4.1 Caspases.....	85
3.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	107
3.6 EOSINOFLUORESCÊNCIA.....	114
3.6.1 Microscopia de fluorescência e apoptose	114
4. MATERIAL E MÉTODO	118
4.1 ANIMAIS.....	118
4.2 DETERMINAÇÃO DAS IDADES FETAIS	119
4.3 REMOÇÃO DOS PLACENTÔNIOS	119
4.4 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA DE LUZ	120
4.4.1 Processamento em paraplast (Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus, Oxford Lab., USA) e obtenção dos cortes de tecido	120
4.5 DETECÇÃO DE APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	121
4.5.1 Anticorpos e reagentes.....	121
4.5.1 Detecção de apoptose	121

4.5.2 Detecção de proliferação celular	122
4.6 UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	123
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	124
5. RESULTADOS.....	126
5.1 DETECÇÃO DE APOPTOSE.....	126
5.1.1 Imunoistoquímica.....	126
5.2 DETECÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM PLACENTA DE BÚFALA .	147
5.2.1 PCNA	147
5.3 DETECÇÃO DE APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (EOSINOFLUORESCÊNCIA)	157
6. DISCUSSÃO	160
7. CONCLUSÕES	167
REFERÊNCIAS.....	169
ANEXOS	182

1 INTRODUÇÃO

Oficialmente o início da bufalinocultura no Brasil data de 1890, embora extra-oficialmente haja indícios de que os primeiros animais tenham chegado da Itália em 1747 (MIRANDA, 1986). Apesar destes dados, foi nas últimas três décadas que houve um maior crescimento do rebanho e de sua produtividade, inclusive mundialmente.

Nos últimos 30 anos, a população mundial de búfalos aumentou cerca de 50%, o que pode ser vinculado a um aumento de 200% na sua produção leiteira (FAO, 1999), gerando expectativas quanto ao suprimento de carne e leite dos mercados nacional e internacional.

Há atualmente muitos projetos em desenvolvimento visando melhorar a eficiência e os ganhos na produção, como os da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos em parceria com o Ministério da Agricultura e algumas empresas privadas. Para tanto, há que se ater fundamentalmente aos aspectos reprodutivos, por estarem diretamente relacionados à lucratividade do plantel (LOURES, 2001).

Neste aspecto, podemos citar alguns fatores, tais como o atraso na idade ao primeiro parto, problemas de manejo quanto à detecção de cio, aumento no intervalo entre partos, entre outros. Permanecem obscuros importantes detalhes do desenvolvimento gestacional, especialmente no tocante à placenta, apesar das evidências de que falhas reprodutivas possam ocorrer em decorrência da ineficiência placentária durante a prenhez, como a pré-eclâmpsia (AUSTGULEN, 2004), comprometendo o tamanho do feto ao nascimento ou ainda devido à sua retenção

(BOOS, 2003), levando à uma subsequente infertilidade ou mesmo à morte do animal.

O crescimento, maturação e liberação placentários dependem da homeostase tecidual, caracterizada basicamente por dois fenômenos biológicos: a proliferação celular e a apoptose ou morte celular programada. O processo de apoptose parece ser determinante para o desenvolvimento tanto embrionário (GOWN; WILLINGHAM, 2002), quanto placentário, atuando na remodelagem e no envelhecimento deste órgão temporário (SMITH, 1997).

A placenta dos ruminantes é classificada como sendo sinepiteliocorial, policotiledonária e vilosa, apresentando áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais, os placentônios, que constituem a união entre carúncula materna e cotilédone fetal. Nesta interface ocorrem as trocas metabólicas indispensáveis para o desenvolvimento do conceito.

A evidenciação de células apoptóticas tem sido realizada através da utilização de marcadores celulares, alguns deles voltados para a detecção de fragmentos de DNA e mais adequados para estudos com cultura de células, posto que tais modificações nucleares não sejam facilmente interpretáveis em cortes de tecidos previamente incluídos em parafina, os quais representam verdadeiros arquivos teciduais (GOWN; WILLINGHAM, 2002).

Devido à importância deste material de estudo em processos patológicos, é de extremo interesse a padronização de técnicas que permitam a detecção da morte celular. Anticorpos mono e policlonais utilizados em métodos imunoistoquímicos têm alta especificidade no alcance de células em apoptose ou em

proliferação. A microscopia de fluorescência também tem sido adotada em estudos oncológicos (STICHCOMBE, 1995; WOOD, 1999).

O estudo dos fenômenos proliferativos e de morte celular da placenta permite que façamos inferências sobre detalhes da fisiologia do órgão e suas implicações no processo gestacional como um todo, o que no caso dos ruminantes é de fundamental importância, uma vez que a ocorrência de abortamentos e de retenção de secundinas têm sido relatadas como sendo fruto de falhas no desenvolvimento placentário.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão abaixo descritos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo da apoptose e proliferação em placentônios de búfalas em diferentes fases gestacionais, especialmente na interface materno-fetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detecção de apoptose por pesquisa de citoqueratina 18 (anticorpo monoclonal M30 CytoDeath) nos placentônios, durante toda a gestação.
- Detecção de apoptose por pesquisa de caspase 3 clivada nos placentônios, durante toda a gestação,
- Detecção de proliferação celular durante toda a gestação.
- Detecção de corpúsculos apoptóticos em cortes corados com Hematoxilina-Eosina, utilizando-se de microscopia de fluorescência.
- Estabelecer uma correlação entre o desenvolvimento, maturação e liberação placentários e a ocorrência de apoptose na placenta de ruminantes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Trataremos a seguir de diversos temas encontrados na literatura, pertinentes ao nosso trabalho.

3.1 O BÚFALO

A população mundial de búfalos domesticados (*Bubalus bubalis*) é de aproximadamente 130 milhões. Em nosso país é de aproximadamente um milhão, cento e cinquenta mil cabeças, segundo o Ministério da Agricultura (IBGE, 2003), podendo ser classificada como sendo do tipo rio (*river buffalo*) ou do tipo pântano (*swamp buffalo*) (HAFEZ, 2004).

Os búfalos de pântano, como os da raça Carabao, de coloração marrom ou cinza, destinam-se à produção de carne, e o búfalo d'água ou de rio, ou ainda búfalo negro, como os da raça Murrah, Jafarabadi, e os Pretos do Mediterrâneo apresentam dupla aptidão. Há ainda os Nili Ravi, animais de pele negra ou marrom, semelhantes aos Murrah, de aptidão leiteira. Os búfalos de rio compõem cerca de 90% do rebanho mundial, sendo criado em cerca de 50 países, concentrando-se sobretudo na Ásia (RANJHAN, 2001). No Brasil predomina o segundo grupo (NÚÑEZ PÑERO, 2000).

O búfalo detém uma enorme capacidade de converter matérias-primas de baixo valor nutritivo em proteína animal de alta qualidade, além de sua grande adaptabilidade ao pastejo em regiões de terras baixas, inundáveis, solos pouco férteis, com umidade relativa do ar alta e temperaturas variando entre 0^o a 45^oC (NÚÑEZ, 2000). A criação apresenta boa eficiência reprodutiva e rápido

desenvolvimento ponderal, com índices reprodutivos próximos aos dos bovídeos, sendo que o período de prenhez varia de aproximadamente 305 a 320 dias.

Na região amazônica funciona desde 1974 a Unidade de Investigação de Bubalinos, da EMBRAPA, no município de Belém. O búfalo adaptou-se bem à este meio, sendo alvo de diversos estudos nutricionais, genéticos, reprodutivos, clínicos e de manejo, visando o incremento econômico da produção leiteira e de carne.

Comparado ao bovino, o búfalo apresenta algumas vantagens em sua criação, podendo pastar em terras inundáveis e de baixa fertilidade, onde apenas o gado Zebu serviria às mesmas condições; apresenta maior precocidade, é um animal dócil principalmente à ordenha, possui maior longevidade, com índices de natalidade 20 a 30% maiores que os dos bovinos, sendo ainda mais resistente às doenças (mortalidade ao redor de 2-4%).

No tocante à produção de leite, apesar da quantidade diária ser menor, a duração da lactação é maior, e a qualidade do leite superior, apresentando valor agregado para o produtor na venda do produto às indústrias. Quanto à carne, pode ser superada à bovina quando de uma alimentação balanceada.

Dentre as desvantagens, temos a necessidade de instalações mais resistentes, com sombras e lagos, o manejo é diferente, apresenta maior susceptibilidade à brucelose e o tempo de gestação é maior (1 mês e meio, aproximadamente: 320 dias, para bubalinos, contra 284 dias, para bovinos) (NÚÑEZ PÑERO., 2000). Entretanto, a rusticidade e o desempenho da espécie são fatores preponderantes para sua progressiva exploração no Terceiro Milênio, posto que o rápido processo de industrialização, automação e urbanização tem levado à diminuição sistemática da flora e fauna, de pastagens e habitats naturais de animais domésticos e selvagens (RANJHAN, 2001).

3.2 PLACENTA E PLACENTAÇÃO

A prenhez, gravidez ou gestação é o estado particular das fêmeas, decorrente da fecundação de um ou mais óvulos, sua nidificação ou placentação e evolução, até sua expulsão, decorrente de abortamento ou parto (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

3.2.1 Implantação

Implantação define-se pelo contato físico, após a dissolução da zona pelúcida e a saída do blastocisto, entre as células trofoblásticas (trofoblasto embrionário) e o epitélio uterino (endométrio), os quais completam sua adesão, até a formação da placenta característica de cada espécie. Há um complexo controle hormonal ovariano por trás deste processo (GRUNERT; BIRGEL, 1982; TACHI; STRAUSS, 1987). O trofoblasto representa a camada decisiva no tocante às trocas entre mãe e feto (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A implantação nos ruminantes apresenta, segundo Guillomot, Fléchon, Wintenberg-Torrès (1981), três estágios: um longo período de pré-adesão no qual o conceito elonga-se grandemente; um estágio de aposição quando contatos celulares são estabelecidos entre os epitélios do trofoblasto fetal e uterino; e o estágio de adesão que dá origem às estruturas da placenta epiteliocorial.

Após a fecundação desenvolvem-se, a partir do óvulo fecundado ou zigoto, novas células ou blastômeros, por mitose, originando a mórula, possuidora de duas camadas, uma interna e outra externa; a externa ou trofoblasto, nutre o embrião, e a interna ou embrioblasto, promove sua formação. A partir do trofoblasto e com a

participação embrionária, formam-se os envoltórios fetais (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

A implantação do embrião se faz mais ou menos profundamente no útero, de acordo com a agressividade do cório. Nos ruminantes, as relações com o cório são superficiais, sendo o tecido fetal facilmente separado do materno. O processo se dá por ação do estrógeno, ao redor do 35^o dia na VACA, com a completa fusão entre as vilosidades coriais e o endométrio (MIES FILHO, 1987).

A transmigração é rara nas vacas. A elongação do blastocisto se dá nos dias 12-13; o concepto normalmente fixa-se próximo à metade do corno ipsilateral ao corpo lúteo, enquanto o cório continua a elongar-se até ocupar toda a extensão do lúmen. Na terceira semana de gestação as projeções do cório inserem-se às aberturas das glândulas endometriais, o que representa um possível inicial mecanismo de estabelecimento da posição do blastocisto (KING et al., 1982).

Nas vacas a implantação ocorre entre 11 e 40 dias após a fecundação (GRUNERT; BIRGEL, 1982) ou, segundo Roberts (1986), do primeiro ao quarto mês de gestação. Esta fase precede a placentação, que consiste na justaposição das vilosidades do cório fetal ou porção fetal da placenta, com as criptas da mucosa uterina. Posto que nos ruminantes estas duas porções não sejam firmemente aderidas, uma vez que os anexos fetais não são eliminados durante o parto juntamente com o feto, não formando tais tecidos um órgão único, estas placentas são chamadas *adeciduadas* e não são consideradas placentas verdadeiras (“placenta vera”), mas sim *semiplacentas* (GRUNERT; BIRGEL, 1982; MIES FILHO, 1987).

Nos animais indeciduados, a fixação se dá após a formação da placenta, permanecendo o embrião livre na cavidade uterina neste ínterim (MIES FILHO, 1987).

O processo de aderência em ruminantes envolve as áreas caruncular e intercaruncular endometriais (HAFEZ, 2004). O epitélio materno nestas regiões de adesão é composto de células uniformemente colunares, enquanto que as células coriônicas variam de cuboidais a colunares baixas (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982). Uma adesão transitória ocorre inicialmente, à medida que os conceptos desenvolvem as vilosidades em forma de dedos (papilas), as quais se projetam para o lúmen das glândulas uterinas. Inicialmente há perda dos microvilos do trofoblasto para maior contato deste com a superfície uterina. Os microvilos do epitélio uterino interagem com as projeções citoplasmáticas da superfície do trofoblasto até que os microvilos trofoblásticos desenvolvam-se novamente, promovendo maior adesão. Células binucleadas ou multinucleadas estão espalhadas esparsamente em todo o cório e mais raramente no epitélio uterino ou atravessando a interface materno-fetal (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982). A aderência placentária caracteriza-se pelo aparecimento destas células binucleadas, que crescem a partir das células mononucleadas dos trofoblastos. Elas aparecem no dia 17 e permanecem por toda a prenhez. A partir do dia 21 aumenta o número de binucleadas, que se concentram em grupos. Tais células migram e se fusionam ao epitélio uterino formando assim as células multinucleadas ou um sincício, eventualmente relacionado à defesa imunológica do conceito e na transferência de lactogênio placentário, por elas sintetizado, à circulação materna (HAFEZ, 2004). O epitélio materno continua colunar na maioria de sua extensão, apesar do aporte de células bi- e multinucleadas, mas parece que em algumas áreas isoladas de

algumas carúnculas torna-se plano ou cuboidal entre os dias 20-21, podendo mesmo estar ausente ao redor da quarta ou quinta semana (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982).

Durante a implantação há o desenvolvimento de papilas trofoblásticas nas áreas em que o conceito se aproxima da abertura das glândulas uterinas, situadas na região interplacentomal, e o contato destas papilas com o lúmen glandular permite a absorção, ao nível de estruturas absorptivas especializadas ou aréolas placentárias, de proteínas e substâncias secretadas por elas, o histotrofo, que é composto por enzimas, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas, hormônios, proteínas de transporte e outras substâncias nutritivas, as quais regulam a sobrevivência do conceito, assim como o seu desenvolvimento, e produzem sinais de reconhecimento da prenhez, implantação e placentação. Nas aréolas também ocorre a fagocitose de leite uterino pelas células trofoblásticas; de modo semelhante, na zona arcada (situada entre as bases dos vilos cotiledonários, na região dos topos dos vilos maternos, onde há contato entre ambos) células mononucleadas de revestimento estão envolvidas na fagocitose de macromoléculas, especialmente eritrócitos (PEREIRA et al., 2001). Além dos eritrócitos, as células trofoblásticas podem engolfar leucócitos maternos, células epiteliais vizinhas e células gigantes (MYAGKAYA, 1981).

3.2.1.1 FORMAÇÃO DAS MEMBRANAS FETAIS

Quatro membranas distintas estão envolvidas no desenvolvimento placentário: o cório, o âmnio, o saco vitelínico e o saco alantóide (MOSSMAN, 1987).

Após a fertilização, o embrião passa a dividir-se até o estágio de mórula. As células que inicialmente compõe o embrião são chamadas blastômeros. O estágio de blastocisto se dá quando o embrião desenvolve uma cavidade central cheia de líquido, a blastocèle, circundada por uma única camada celular, a trofoectoderme. Tais células formando esta parede externa, assumem funções especializadas e são tidas como células trofoblásticas, recobrando a parte exterior da placenta em todos os animais domésticos. Esta camada, juntamente com o mesoderme parietal ou somático formam o cório. Durante o estágio de blastocisto o embrião desenvolve uma cavidade central cheia de líquido, a blastocèle, circundada por uma camada única de células, a trofoectoderme, que recobre a superfície externa da placenta. Junto com o mesoderme somático (parietal), formam o córioalantóide (SCHLAFER, 2000). O córioalantóide ricamente vascularizado é revestido externamente por células do epitélio trofoblástico que possuem funções especializadas. Dois tipos morfológicamente distintos são encontrados nestas placentas, as células mononucleadas e as binucleadas. As primeiras compõem a maioria das células da interface e estão primariamente envolvidas na troca de nutrientes; as binucleadas são células de síntese, produtoras de hormônios, tais como progesterona e lactogênio placentário (IGWEBUIKE, 2005).

O cório representa o elemento de contato com a parede materna e diferencia-se cedo, em vilosidades, as quais são capazes de digerir substâncias que estejam ao seu alcance, nutrindo o embrião com o leite uterino (MIES FILHO, 1987). É uma

camada epitelial derivada da parede mais externa do blastocisto, o trofoblasto. Durante a implantação, é completada por uma camada interna de mesênquima, de origem embrionária, o qual desenvolve seu sistema de capilares. A cavidade circundada pelo cório e que contém o embrião, a vesícula amniótica, o saco vitelínico e o alantóide é denominada de exocele (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Com o tempo mais líquido é produzido na blastocele resultando no aumento do tamanho do embrião (“blastocisto expandido”). A blastocele cheia de fluidos se tornará a cavidade do saco vitelino. Neste estágio, outras células especializadas replicam-se, a chamada massa celular interna, para formar o embrião propriamente dito, concentrando-se num dos pólos do blastocisto. Outra camada celular (endoderme) cresce a partir desta última (trofoectoderme), revestindo a cavidade do saco vitelino, e uma terceira, a mesoderme, se estenderá a partir do disco embrionário para formar uma camada entre a trofoectoderme e a endoderme. O blastocisto expandido apresenta estas três camadas. A seguir o embrião alonga-se. O âmnio formará dobras de células trofoectoblásticas juntamente com a mesoderme somática ao redor do embrião, juntando-se a ele e criando um espaço cheio de fluidos ao seu redor (SCHLAFER, 2000).

O âmnio representa um envoltório que recobre o embrião, repleto de líquido amniótico, rico em albumina, uréia, sais minerais e açúcar (MIES FILHO, 1987); trata-se de outra camada epitelial, derivada do ectoderme embrionário e possuidora também de um mesênquima de sustentação, embora desprovido de veias, sendo um segundo envoltório embrionário/fetal (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Quando o embrião torna-se feto, mas antes da parede ventral abdominal fechar-se, uma evaginação do intestino posterior estende-se do feto até o tecido frouxo do mesoderma esplâncnico. Esta estrutura em forma de saco é o alantóide e,

juntamente com o mesoderma esplâncnico transporta as veias que irão vascularizar o cório e o âmnio (SCHLAFER, 2000).

Por último, o alantóide em expansão sobrepõe-se diretamente ao cório. Eles se fundem formando o córioalantóide; com o âmnio, compõem as membranas fetais extra-embrionárias. De acordo com a espécie envolvida o córioalantóide irá assumir diferentes formas, às vezes invadindo o endométrio do útero grávido.

O alantóide desenvolve-se e contacta a parede interna do cório, orientando os vasos fetais a partir do cordão umbilical e promovendo sua distribuição, de acordo com as vilosidades fetais, além de receber as excreções do embrião (MIES FILHO, 1987). É a vesícula urinária extra-embrionária, originário do intestino posterior embrionário ou entoderme, e cercada de tecido mesenquimal vascularizado. Funde-se com os vasos do cório formando a placenta córioalantóide, própria dos mamíferos, ou seja, a membrana coriônica está conectada à circulação fetal através das veias alantóides (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O saco vitelínico desenvolve-se a partir do intestino médio embrionário. É uma camada de epitélio endodérmico e mesênquima fetal vascularizado. Nos ruminantes é uma estrutura rudimentar, não participando das trocas entre mãe e feto (LEISER; KAUFMANN, 1994). Nos mamíferos, regride simultaneamente à evolução embrionária (MIES FILHO, 1987).

Na placenta sindesmocorial de bovinos e bubalinos, cuja classificação completa será descrita a seguir, o cório agride o epitélio uterino alcançando o tecido conjuntivo epitelial. Esta relação não se verifica em toda a superfície do útero, mas em determinadas áreas desprovidas de glândulas, as carúnculas uterinas. Os cotilédones fetais unem-se à estas formando os placentônios (MIES FILHO, 1987).

3.2.2 Placenta

Segundo Vale (1988), o sistema genital da búfala e o da vaca são semelhantes morfológicamente, apesar de existirem divergências no tocante aos aspectos reprodutivos, como puberdade, maturidade sexual e duração de gestação, uma vez que as búfalas são menos precoces que as vacas e apresentam maior período gestacional.

A duração da gestação varia com a espécie animal e, dentro da espécie, com a raça, número de crias, sexo, sazonalidade, nutrição e posição geográfica (MIES FILHO, 1987; VALE, 1988).

As búfalas apresentam período gestacional mais longo que as vacas, variando entre 305 e 320 dias nos animais do rio e entre 320 e 340 dias, nos animais de pântano. O período de gestação divide-se em duas fases, a embrionária, mais curta e caracterizada por ativa diferenciação celular (45 dias para a vaca), e a fase fetal, na qual predomina o crescimento do feto (HAFEZ, 2004).

Na gestação, o endométrio tem papel central, sendo a membrana mucosa que reveste o útero gravídico; é a parte do útero que hospeda o conceito.

Nem todos os mamíferos são placentados ou parem filhotes plenamente desenvolvidos; a classificação abrange mamíferos prototérios, que são ovíparos, metatérios, que apresentam placenta vitelina transitória, não havendo contato íntimo entre as membranas fetais e a mucosa uterina, e os eutérios, que compreendem todo o resto, os chamados “mamíferos placentados verdadeiros”, tendo a placenta formada por membranas fetais e o endométrio (BANKS, 1992).

A vaca é uma das espécies eutérias, ou seja, possuidoras de placenta. Há poucas semelhanças entre a placenta humana e a bovina, mas durante o início do

período embrionário, antes da entrada no útero, percebe-se alguma identidade. Após o desenvolvimento placentário evidenciam-se as diferenças (SCHLAFER, 2000).

A placenta é um órgão multifuncional que ancora o feto no interior do útero, sendo o sítio de troca de nutrientes e resíduos entre o conceito e a mãe, provendo uma barreira celular contra patógenos e um obstáculo ao sistema imune materno, além de participar extensivamente na troca seletiva de informações bioquímicas para a manutenção gestacional. São classificadas basicamente quanto ao número de camadas que separam o sangue materno e fetal e pela maneira que o cório se adere ao tecido uterino (ROBERTS; ANTHONY, 1994). É composta de duas partes: a placenta fetal ou corioalantóide, e a placenta materna ou endométrio (ROBERTS, 1986).

Neste órgão temporário, os tecidos embrionários ou fetais estão apostos aos tecidos parentais, formando uma unidade funcional para as trocas fisiológicas (TACHI; STRAUSS, 1987).

A placenta é o órgão responsável pelas trocas metabólicas materno-fetais de substâncias nutritivas e de enzimas, assim como a síntese de hormônios e a termorregulação. As vilosidades coriônicas justapõem as circulações da mãe e do feto, permitindo al processo. Sua função compreende àquelas exercidas pelos aparelhos digestório, respiratório, renal e circulatório, além da defesa imunológica (GRUNERT; BIRGEL, 1982). Entre as suas diversas funções, temos: nutrição, aporte de aminoácidos, glicerol, ácidos graxos glicogênio e sais minerais, de eliminação de catabólitos, de secreção hormonal, como gonadotrofina coriônica, hormônio de crescimento, prolactina coriônica, estrógeno, progesterona, prostaglandina e

enzimas de ação local, e ainda de defesa, impedindo a passagem de patógenos ao feto e protegendo-o contra choques (MIES FILHO, 1987).

É através do contato entre o endométrio e o conceito e suas secreções que a mãe reconhece fisiologicamente a prenhez; assim, quando há falha na gestação, provavelmente não há envolvimento endometrial, sendo mais provável um distúrbio hormonal.

A absorção das secreções das glândulas uterinas é importante na nutrição fetal durante a gestação de ruminantes.

O endométrio entre as carúnculas é tido como intercaruncular ou intercotiledonário e não participa das funções placentárias (ROBERTS, 1986).

O corpo lúteo permanece praticamente durante toda a gestação. A placenta secreta progesterona até o final do período. A manutenção da prenhez depende da concentração deste hormônio. Na vaca ele é de formação exclusiva do corpo lúteo (GRUNERT; BIRGEL, 1982). A placenta regula sua própria produção de progesterona, independente da secreção de gonadotrofinas hipofisárias. Os principais hormônios produzidos na vaca são o lactogênio placentário e gonadotrofinas coriônicas (TACHI; STRAUSS, 1987). Enquanto órgão endócrino, é produtor de progesterona e relaxina (BANKS, 1992).

Há duas áreas principais na placenta de ruminantes, a interplacentomal, relacionada com transferência histotrófica e a região placentomal que atua na troca hemotrófica de nutrientes e metabólitos (SCHLAFER, 2000). Nas áreas interplacentomais há mera aposição entre as membranas fetais e o epitélio uterino, mas nos placentônios a superfície endometrial possui profundas criptas carunculares, penetradas por longos e ramificados vilos cotiledonários de córioalantóide fetal, o que aumenta grandemente a área de contato superficial entre

mãe e feto. Os microvilos permitem a absorção de materiais. Macromoléculas são transportadas através da placenta por difusão facilitada ou endocitose.

A placenta bovina, no tocante à morfologia externa, é do tipo multiplex; histologicamente, é sindesmocorial. A ação hormonal ovariana é fundamental nos primeiros dois terços da gestação. Lactogênio placentário e gonadotrofinas coriônicas são sintetizadas (TACHI; STRAUSS, 1987).

Na maioria das placentas de mamíferos, o trofoblasto representa a maior parte da porção fetal, e a decídua é o principal tecido materno envolvido. Nos humanos, o trofoblasto é composto de duas camadas distintas, uma mais próxima ao centro do vilos, o citotrofoblasto, e que desaparece após o quarto mês de gestação, e outra mais externa ou sinciotrofoblasto. O mesênquima dos vilos coriônicos apresenta macrófagos. A maioria dos hormônios placentários peptídicos e esteróides são sintetizados pelo sinciotrofoblasto, embora alguns sejam provenientes do citotrofoblasto (TACHI; STRAUSS, 1987).

A placenta promove o reconhecimento materno da gestação e sobrevivência do feto através da secreção de interferon tau, o qual inibe a regressão do corpo lúteo através da supressão da liberação endometrial de prostaglandina F2 α . O interferon tau também evita a expressão dos receptores de ocitocina endometriais e afeta a síntese de citocinas referentes à imunomodulação, prevenindo assim a rejeição do conceito. Também está relacionado à adesão do blastocisto à superfície do endométrio (IGWEBUIKE, 2005).

A estrutura e classificação da placenta têm sido muito estudadas, apresentando grande diversidade entre as espécies.

Historicamente, a classificação da placenta tomando-se por base suas características macroscópicas é a mais antiga de todas. Apenas o tipo multiplex

(múltipla) parece ser significativo no tocante às relações filogenéticas dos grupos principais. Na verdade, a anatomia macroscópica tem significância na interpretação das diferenças anatômicas em determinada placenta por ser diretamente relacionada ao padrão morfogenético das membranas das espécies (MOSSMAN,1987).

As placentas são classificadas de acordo com o tipo de contato, membranas extra-embrionárias participantes, implantação, conexão coriônica e combinação de tecidos maternos e fetais (BANKS,1992). Ou, segundo Leiser e Kaufmann (1994), conforme o tipo de membrana placentária, a forma da placenta, a interdigitação materno-fetal, as diversas camadas da barreira placentária ou interhemática, a invasividade do trofoblasto e a reação decidual, o fluxo sangüíneo materno-fetal e a separação placentária ao nascimento.

Em ruminantes a placentação é adecidual, com útero duplex ou bicornuado, placenta epiteliocorial, aréolas, arcadas e anéis absortivos marginais ao redor dos cotilédones (MOSSMAN, 1987).

Quanto à implantação, é tida como não-decídua, aposta ou de nidação superficial . A placenta corioalantoidiana é a placenta definitiva ou verdadeira dos eutérios, formada pela fusão do mesoderma alantoidiano com o mesoderma coriônico (BANKS, 1992).

Nos ruminantes há formações diferenciadas que constituem os cotilédones, os quais através das vilosidades unem-se às criptas das carúnculas formadas na mucosa uterina (GRUNERT; BIRGEL,1982). De acordo com a distribuição das vilosidades coriônicas, os ruminantes apresentam placenta cotiledonária ou múltipla, as vilosidades agrupando-se na formação dos cotilédones e estes unindo-se às carúnculas endometriais, regiões da lâmina própria submucosa do endométrio

altamente vascularizadas e desprovidas de glândulas uterinas, para formarem o placentônio, resultado da união do cotilédone e da carúncula, portanto (GRUNERT; BIRGEL, 1982; BANKS, 1992). A placenta da búfala é classificada como cotiledonária ou múltipla/multiplex (MIES FILHO, 1987). O tipo cotiledonar ocorre nos ruminantes e apenas a porção materna da placenta (carúnculas endometriais) e porções do córioalantóide (cotilédones) participam da troca de nutrientes, gases e líquidos entre as duas circulações, materna e fetal (ROBERTS, 1986).

A placenta de búfalos é classificada macroscopicamente como sendo múltipla ou cotiledonária (PEREIRA et al., 2001; IGWEBUIKE, 2005). Na figura 1 temos a representação esquemática deste tipo de placenta, enquanto que na figura 2 pode-se observar, no tecido placentário, os pontos de conexão entre mãe e feto.

Figura 1 - Representação da placenta cotiledonária bovina.
(Extraído de RICHTER e GÖETZE, 1978)

Figura 2 - Placentônio de vaca no ultimo mês de gestação. cotilédone e carúncula estão separados um do outro (Hannover; Extraído de RICHTER; GÖETZE, 1978).

Quanto aos padrões de interdigitação, relacionado ao padrão geométrico no qual os tecidos da mãe e do feto estão dispostos, referindo-se às junções coriônicas, os ruminantes apresentam o tipo viloso, o cório formando vilos em forma de árvores que se encaixam perfeitamente ao tecido materno correspondente, as criptas, formadas de tecido endometrial intacto (BANKS,1992; LEISER; KAUFMANN, 1994).

Um terceiro critério mais amplo e genérico baseia-se na adaptação para o intercâmbio entre o embrião e a mãe.

Kaufmann e Burton (1994) classificaram a placenta dos ruminantes como epiteliocorial, com o trofoblasto simplesmente aposto ao epitélio uterino, sem destruição ou invasão do epitélio uterino. Há a interdigitação dos vilos fetais às criptas das carúnculas maternas.

A placenta epiteliocorial dos animais ungulados deve-se ao concomitante desenvolvimento e crescimento das criptas epiteliais endometriais e dos vilos corioalantóides que nelas se encaixam. Ambos os tecidos, materno e fetal, colaboram para o processo. O aumento na espessura da placenta deste tipo é decorrente do crescimento de tais tecidos e não apenas de uma invasão endometrial pelos tecidos fetais. O trofoblasto e o epitélio das criptas usualmente apresentam processos citoplasmáticos e microvilos que se interdigitam; ambos também tornam-se bastante delgados onde capilares maternos e fetais estão adjacentes uns aos outros (MOSSMAN, 1987).

No que se refere à membrana interhemática, a descrição das camadas teciduais que separam mãe e feto foi primariamente feita por Grosser em (1909, 1927) *apud* Leiser e Kaufmann (1994), e seriam seis, no total: endotélio materno, tecido conjuntivo, epitélio materno; a seguir, trofoblasto ou epitélio coriônico, tecido conjuntivo e endotélio fetais. Na condição sindesmocorial (WOODING, 1981, 1992), ou sinepiteliocorial dos ruminantes há semelhanças com o tipo epiteliocorial, apesar do fato de algumas células trofoblásticas ditas binucleadas ou gigantes fundirem-se às células do epitélio uterino formando simplasmas híbridos.

GROSSER, O. Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihäute und placenta. Wien : Wilhelm Braumüller, 1909. p.89-110.

GROSSER, O. Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere. J.F. Bergmann, München, 1927.

A placenta sindesmocorial é encontrada em ruminantes, onde apenas falta o epitélio endometrial (ROBERTS, 1986); esta perda tecidual deve-se à fagocitose e citólise promovidas pelas células trofoblásticas (AMOROSO, 1952). Wimsatt (1980) considerou a placenta das vacas como sendo epiteliocorial.

De acordo com Amoroso (1952), as células binucleadas têm um papel bastante claro no estabelecimento e manutenção das estruturas placentárias na interface materno-fetal durante toda a gestação. Na vaca, ovelha e cabra, logo após a implantação, a estrutura é tida como sindesmocorial, persistindo essa situação nos cotilédones da cabra e ovelha até o parto; nas regiões intercotiledonárias e na placenta da vaca e do veado, como um todo, uma relação epiteliocorial é restabelecida após esse período, através da regeneração do epitélio uterino (WOODING, 1982).

De acordo com as possibilidades de justaposição das porções materno e fetais, a placenta de ruminantes foi a princípio classificada como epiteliocorial e não sindesmocorial, uma vez que por microscopia eletrônica foi demonstrado que as criptas das carúnculas desprovidas de sincícios são de origem epitelial materna e não trofoblástica (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

A capacidade fagocitária do epitélio coriônico difere entre as espécies. No caso dos ruminantes, devido à perda de epitélio sofrida pelas carúnculas uterinas, o cório contacta com o tecido conjuntivo endometrial, originando a placenta sindesmocorial, onde a barreira interhemática é composta por 5 camadas, desaparecendo o epitélio do endométrio (SIMÕES, 1984).

As vilosidades coriais não variam histologicamente, o que varia é o endométrio, que sofre maior ou menor ação do cório (MIES FILHO, 1987).

A placenta sindesmocorial é freqüentemente classificada com um tipo da epiteliocorial, uma vez que o componente trofoblástico invasivo compreende apenas uma pequena fração em relação à placenta toda. Entretanto, quanto à sua função, são divergentes, não devendo ser consideradas equivalentes (TACHI; STRAUSS, 1987).

Em se tratando de barreira placentária, a placenta da vaca classifica-se entre epiteliocorial e sindesmocorial, apresentando todas as seis camadas no primeiro caso e depois passando a cinco, quando da erosão focal do epitélio uterino, entrando o epitélio coriônico em contato com o tecido conjuntivo materno (BANKS, 1992).

A diminuição das camadas está relacionada à agressividade do trofoblasto, da erosão provocada no epitélio uterino, fazendo com que o trofoblasto atinja o tecido conjuntivo materno. A condição sindesmocorial é um estágio transitório nos mamíferos; após invasão, o trofoblasto entra em contato mais íntimo com o endotélio materno. A não-invasividade do conceito também influencia o tipo de separação placentária, sendo que a dos ruminantes é chamada de indeciduada ou placenta *apposita*. No delivramento há pouco material materno envolvido (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Histologicamente, no que se refere às relações coriônicas e mucosa uterina, a placenta dos ruminantes é considerada como sindesmocorial, pois o epitélio uterino desaparece durante a implantação, ficando as vilosidades coriônicas mergulhadas em tecido conjuntivo endometrial; há portanto o desaparecimento do epitélio de revestimento do lúmen uterino, em relação ao tipo epiteliocorial (GEORGE; CASTRO, 1998).

Nas búfalas, em relação às camadas que compõe a barreira placentária, a placenta é classificada como sinepiteliocorial, histologicamente, devido à migração e fusão de células binucleadas trofoblásticas com células do epitélio uterino (CARVALHO, 2000; IGWEBUIKE, 2005).

No tocante ao fluxo sangüíneo materno-fetal, está situada entre o fluxo de contra-corrente e o multiviloso (DANTZER, 1988). Em muitos ruminantes, no que se refere ao arranjo vascular materno-fetal, parece haver uma mistura entre os tipos concorrente e contra-corrente. O termo escolhido para designá-la foi “crosscurrent” (corrente secundária).

Quanto à forma, a área de contato entre mãe e feto depende da intensidade das interdigitações entre ambos os tecidos; na maioria dos mamíferos, estão concentradas em áreas limitadas. Nos ruminantes (BJÖRKMAN, 1969) caracteriza-se por muitas áreas pontuais, os placentônios, separados por áreas intercotiledonárias de cório liso ou paraplacenta, as quais também participam do processo de trocas materno-fetais; nos ruminantes são de origem córioalantóide. O local de concentração dos placentônios, de tecido corioalantóide, é denominado cório frondoso. Nas figuras 3 e 4 temos a representação esquemática e uma foto ilustrativa do placentônio bovino, respectivamente.

O endométrio dos ruminantes é composto de carúnculas uterinas e áreas intercarunculares nas quais abrem-se glândulas uterinas. As carúnculas são estruturas especializadas, aglandulares, que interagem com o córioalantóide para formar os placentônios. A aposição e adesão ocorrem em toda a superfície uterina (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982).

Figura 3 - Placentônio da vaca (Giessen; Extraído de RICHTER; GÖETZE, 1978)

Figura 4 - Placentônio de placenta bovina a termo com artérias umbilicais injetadas com látex-Neoprene colorido. Observar o padrão intrincado de ramificação das artérias e veias umbilicais que penetram ou saem do tecido (Extraído de SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000)

Tipicamente, o endométrio dos mamíferos é revestido por um epitélio cuboidal simples que também margeia as saídas e o pescoço da glândulas. O corpo glandular é revestido por epitélio cuboidal, que se torna colunar e ativamente secretor em algumas fases do ciclo.

O estroma endometrial varia de denso, à frouxo e à edematoso ou ainda denso e celular, de acordo com a localização.

Nas espécies não deciduadas não há proliferação das glândulas e do endométrio; as glândulas permanecem funcionais por toda a gestação e após o parto fica relativamente inativa até um estímulo estral ou gestacional.

Há várias estruturas acessórias à placenta definitiva córioalantóide, apesar de algumas, como as zonas arcadas, serem partes intimamente ligadas a ela. Placas absortivas ou simples aréolas, arcadas, topos de vilos absortivos e dobras marginais são comumente associados às placentas vilosas epiteliocoriais ou às labirínticas endoteliocoriais. Hematomas e órgãos hematófagos estão universal e morfológicamente associados às placentas de carnívoros, embora estes últimos tenham sido relatados em placentas de ovelhas (MOSSMAN, 1987).

Kathiresan, Rajasundaram e Pattabiraman (1992) estudaram modificações histológicas e histoquímicas no endométrio e placenta de búfalas em várias fases de prenhez. No endométrio, na região intercaruncular, havia epitélio pseudo-estratificado colunar, mas aos 55 dias de gestação a parte caruncular era destituída de células colunares e lâmina própria, expondo o lúmen.

O cotilédone é a massa tecidual que se desenvolve durante a gestação sobre o topo das carúnculas, sendo estas últimas permanentes elevações do endométrio, enquanto que os cotilédones são reabsorvidos após o parto. Ou ainda, o cotilédone é a parte da placenta fetal produtora de vilos que se projetam nas criptas das

carúnculas maternas. A fusão destas estruturas foi chamada de placentônio por Benesch (1963) e Amoroso (1952). A vaca apresenta de 80 a 140 placentônios (LEISER; KAUFMANN, 1994).

As carúnculas são dispostas em 4 fileiras, sendo 2 ventrais e 2 dorsais, ao longo do cor no uterino. Em número variam entre 75 e 120 carúnculas na vaca (ROBERTS, 1986).

Macroscopicamente, as vilosidades surgem em maciços distribuídos sobre o cório, formando os cotilédones. Estes agregam-se às carúnculas uterinas, projeções da mucosa da matriz. As carúnculas uterinas são convexas na vaca, côncavas na ovelha e planas na cabra. Os placentônios são da ordem dos 100 na vaca, dispostos em quatro fileiras regulares e crescem ao longo da gestação assumindo a forma discóide num primeiro momento e, a seguir, a de um cogumelo contendo um pedículo. A zona intercotiledonar é conhecida como paraplacenta e não há aderência entre cório e endométrio (SIMÕES, 1984). O cório liso é uma membrana córioalantóide da qual veias alantóides e os vilos desapareceram por atrofia. As vilosidades coriais são compostas por cones vasculares mesenquimatosos, rodeados por células trofoblásticas cubóides e células gigantes binucleadas. Inicialmente são projeções delgadas e simples, passando a túrgidas e arborizadas no decorrer da gestação. Penetram diretamente nas criptas vasculares superficiais endometriais estabelecendo intimidade entre vasos maternos e fetais.

Na vaca o córioalantóide adere-se ao epitélio uterino ao redor da quarta semana de gestação, de modo mais íntimo em áreas especializadas do endométrio, as carúnculas, distribuídas em todo o endométrio. Simultaneamente ao crescimento das membranas fetais embrionárias e da expansão para o lúmen do útero, a superfície plana do córioalantóide torna-se irregular sobre estas carúnculas. O

remodelamento destas áreas ou cotilédones irá formar projeções vilosas que se interdigitarão com os recessos nas superfícies carunculares. A superfície das carúnculas desenvolve criptas e o córioalantóide aposto se modela para formar projeções vilosas em forma de dedos que se nelas se encaixam, aumentando a superfície de contato. A união dos tecidos cotiledonário e caruncular denomina-se placentônio. O córioalantóide existente entre os placentônios opõe-se ao endométrio em dobras planas e suaves e é denominado de córioalantóide liso ou interplacentomal. Sua função é suprir as crescentes demandas metabólicas fetais, principalmente o rápido crescimento tecidual, com a produção de hormônios, síntese protéica e fatores de crescimento (SCHLAFER, 2000).

O mesênquima que preenche as vilosidades coriônicas origina os vasos sangüíneos do embrião, os quais comunicam-se com ele através do cordão umbilical, já que a placenta é um órgão extra-embrionário (GEORGE; CASTRO, 1998).

A interação entre porções do córioalantóide e o endométrio se dá em algumas áreas de adesão, os placentônios, sendo a porção fetal o cotilédone e os sítios de contato materno, as carúnculas (IGWEBUIKE, 2005).

Abdel-Raoulf e Badawi (1966) descrevem as carúnculas dos placentônios bubalinos como sendo menores e sem pedúnculo, diferentemente daquelas encontradas em vacas. Aumentam progressivamente no decorrer do período gestacional e apresentam diversas formas, com número médio de 126, variando entre 71 e 229.

Ram e Chandra (1984) relatam haver aumento no número dos placentônios com o avançar da gestação, de 89 para 173, do início à metade do período, respectivamente, para depois diminuir de 162 para 77, quando da gestação a termo.

As células trofoblásticas formam uma camada epitelial contínua com o cório, sobre toda a superfície do córioalantóide. Subpopulações de células trofoblásticas

estão presentes, com diferentes funções. Duas populações de células trofoblásticas mononucleares apresentam fenótipos fagocíticos; tratam-se das células que revestem a zona arcada, localizada na direção do lado fetal do placentônio entre as bases dos vilos cotiledonários. Estas células margeiam os “órgãos hematófagos”, local de acúmulo de eritrócitos maternos entre as superfícies dos tecidos endometrial e córioalantóide, sendo então fagocitados pelas células trofoblásticas.

Uma segunda área especializada em fagocitose é o córioalantóide interplacentomal sobre as aberturas das glândulas endometriais. Acúmulos microscópicos de leite uterino secretado pelas glândulas endometriais promovem o aumento corioalantóide para formar microscópicos espaços em forma de cúpula denominados aréolas. As células trofoblásticas sobre estas câmaras são altas e contêm leite uterino fagocitado.

Outra população celular são os macrófagos fetais, conhecidos na espécie humana como células de Hofbauer. Elas podem se originar tanto do mesênquima coriônico no início da gestação, quanto dos monócitos fetais derivados da medula óssea. Produzem citocinas pró-inflamatórias e atuam na apresentação de antígenos, como células de defesa (SCHLAFFER, 2000).

Relativamente poucos macrófagos fetais estiveram presentes no vilos cotiledonares em fetos abaixo de seis meses de idade, sendo que aos oito meses o número aumentou em mais de dez vezes. As prováveis funções a elas atribuídas são de defesa na placenta fetal e transporte de microrganismos para sítios de inflamação da placenta para o feto via veias umbilicais (SCHLAFFER, 2000).

Linfócitos são observados no epitélio luminal uterino no início da gestação em vacas, diminuindo substancialmente com o tempo, talvez por imunossupressão; o trofoblasto agiria como uma barreira evitando que células imunocompetentes

causem dano ao embrião (AMOROSO; PERRY, 1975; KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982)

As células mononucleadas são cuboidais mononucleares a colunares, com características típicas de células epiteliais. Localizam-se na membrana basal e são conectadas umas às outras por complexos juncionais. Constituem 4/5 da população trofoblástica. Cada uma possui um núcleo único de formato irregular com um único nucléolo e cromatina finamente dispersa (IGWEBUIKE, 2005). Há acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma e vesículas de diferentes tamanhos algumas contendo material em degeneração (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1980). A membrana da superfície apical destas células é modificada, apresentando processos microvilosos que interdigitam-se processos similares das células epiteliais uterinas, formando a zona de contato materno-fetal (BJÖRKMAN, 1969).

Nos ruminantes a interação entre o tecido fetal e materno ocorre em áreas especializadas do endométrio, aglandulares, as carúnculas. Seu número, formato, tamanho são espécie-específicos (KAUFMANN; BURTON, 1994).

As células gigantes trofoblásticas são, analogamente à classificação utilizada em humanos, um tipo de sinciotrofoblasto primitivo.

Aproximadamente um quinto das células trofoblásticas bovinas são binucleadas. Também possuem muitas subpopulações. As células trofoblásticas produzem uma série de hormônios e fatores de crescimento associados ao crescimento fetal e desenvolvimento e manutenção da prenhez (SCHLAFER, 2000).

Tais células também migram para o epitélio uterino, da camada coriônica dos vilos cotiledonários até a camada única de células epiteliais que revestem as criptas carunculares (WOODING, 1982). Algo semelhante ocorre nas áreas interplacentomais. As células binucleadas migram e fundem-se rotineiramente às

células epiteliais endometriais, despejando seus grânulos citoplasmáticos. A fusão de uma célula fetal (binucleada trofoblástica) com uma célula materna forma temporariamente uma célula híbrida com três núcleos.

O resultado da migração das células binucleadas, fenômeno presente em todos os estágios gestacionais, é a fusão desta com o epitélio uterino ou com uma camada sincicial, promovendo a liberação de seus grânulos próximo à circulação materna, enquanto mantém a barreira trofoectodérmica à outras trocas materno-fetais (WOODING, 1982).

As células binucleadas migram através da interface materno-fetal para fundirem-se às células colunares do epitélio uterino materno, formando células híbridas trinucleadas (WOODING, 1984; WANGO; WOODING; HEAP, 1990). O aumento do tamanho destas células trinucleadas para formar placas sinciciais ocorre por migração contínua de células binucleadas que à elas se fundem (WOODING, 1984). Esta capacidade das células binucleadas de migrarem e fundirem-se às células do epitélio uterino resultando na formação de placas sinciciais deu origem à classificação da placenta de ruminantes como sendo sinepiteliocorial (WOODING, 1992).

Amoroso (1952) concluiu pelo uso de microscopia de luz, que nas ovelhas as células binucleadas migravam do epitélio trofoectodérmico para promover a fagocitose e a remoção da camada epitelial uterina na implantação e subsequente formação de um sincício que irá revestir os vilos maternos nos cotilédones. Nos cotilédones da vaca também há migração, mas as binucleadas vão para uma camada celular que recobre os vilos maternos. Boshier (1969) utilizando-se da microscopia eletrônica confirmou a migração, mas negou a fagocitose no epitélio

uterino, o qual por si só formaria o sincício pela fragmentação de suas bordas laterais.

As células binucleadas são encontradas, após a implantação, durante toda a gestação em todos os ruminantes estudados e derivam das células uninucleadas do trofoectoderma fetal. A junção apical é a primeira barreira para a migração; a segunda é o tecido cujos microvilos interdigitam-se com o epitélio trofoectodérmico, e que é composto por células epiteliais uterinas, sofrendo modificações e transformando-se em sincício durante a implantação e desenvolvimento placentário nos ruminantes (AMOROSO, 1952).

Apesar de não promoverem a fagocitose, sua fusão com um sincício remove dali as células epiteliais, substituindo-as, as quais morrem e são então fagocitadas pelas células trofoectodérmicas uninucleadas (WHATHES; WOODING, 1981). No desenvolvimento dos placentônios em cotilédones de ovelhas e cabras os sincícios persistiram e aumentaram bastante em área e número de núcleos, mas não foi observada qualquer divisão nuclear. Entretanto, detectou-se grânulos típicos das células binucleadas no sincício durante toda a gestação, indicando que o seu crescimento baseia-se na constante migração (WOODING, 1980).

No placentônio da vaca e nas áreas interplacentomais de cabras e ovelhas o sincício não persiste por muito tempo, sendo substituído pela reconstituição do epitélio uterino. A subsequente migração das células binucleadas irá produzir as chamadas “células gigantes maternas”, que são freqüentemente trinucleadas. Eventualmente tais células morrem e são reabsorvidas pelo trofoectoderma após a liberação de seus grânulos (WOODING; WATHES, 1980). A origem provável destas células seria a fusão de uma célula fetal binucleada com uma célula única do epitélio uterino, reafirmando a idéia que a migração é sempre seguida de fusão a um

sincício ou à uma célula epitelial uterina. Estudos auto-radiográficos confirmaram que a migração das células binucleadas é a principal, senão a única fonte de núcleos sinciciais.

Na vaca a função da migração parece ser a transferência de seus grânulos, uma vez que após tê-lo feito as células gigantes maternas atrofiam e morrem (WOODING; WATHES, 1980).

O resultado da migração das células binucleadas é sua interação com o epitélio uterino e a produção de um tecido híbrido materno-fetal (sincício ou célula gigante materna). Este processo pode servir como mediador na liberação de produtos fetais específicos para a circulação materna.

A migração contínua é normal, mas observou-se que nas últimas semanas de gestação há uma queda no teor de lactogênio placentário, possivelmente vinculado a um declínio no número de células binucleadas na ovelha (TAYLOR, 1980). Concluiu-se que nos ruminantes a fusão das células binucleadas ao tecido materno pode ser um meio de evitar um ataque dos linfócitos maternos sobre o enxerto fetal.

As células binucleadas parecem estar implicadas na remoção e reposição do epitélio uterino (AMOROSO, 1952), produção de gonadotrofinas coriônicas (BJÖRKMAN, 1954), o estabelecimento de sincício entre os componentes materno e fetal para proteção imunológica (DAVIES; WIMSATT, 1966) e transporte de grandes moléculas, como o lactogênio placentário (STEVEN et al., 1978), como também na assistência física na imobilização de membranas permitindo o desenvolvimento da interdigitação entre os microvilos.

A maior parte do epitélio colunar uterino degenera-se durante o período de implantação e é substituído inicialmente por células multinucleadas. Após este período há regeneração epitelial.

Células binucleadas maduras são grandes e apresentam características estruturais diferentes do epitélio mononuclear que circunda o trofoectoderma (IGWEBUIKE, 2005). Representam de 15 a 20% das células trofoectodérmicas ao início da implantação e durante todo o período gestacional (WOODING, 1982).

Geralmente assume-se que as binucleadas derivam das mononucleadas por mitoses acitocinéticas (BJÖRKMAN, 1968). Foi proposto por Wooding (1992) que qualquer célula trofoblástica normal pode dar origem à uma célula binucleada por divisões nucleares consecutivas, não havendo citocinese. Isso pode ser explicado reportando-se à mitose; a divisão celular ocorre em duas fases: os cromossomos duplicados na fase S são distribuídos igualmente entre as duas células-filhas em potencial, e depois a célula em divisão cliva-se em células-filhas idênticas. Isso ocorre por divisão citoplasmática ou “citocinese”; as quantidades de citoplasma para uma e outra podem variar; a mitose pode ainda ocorrer sem citocinese, tal como na formação de células binucleadas ou multinucleadas (YOUNG; HEATH, 2001).

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento as células binucleadas estão espalhadas ao acaso e localizadas profundamente na camada trofoectodérmica numa posição intra-epitelial, sem contato com a membrana basal ou a lateral apical microvilosa do trofoectoderme (WANGO et al., 1990). Estas células imaturas são esféricas e o citoplasma cora-se em escuro, devido à presença de ribossomos citoplasmáticos.

Nas células maduras estudos ultra-estruturais mostram a presença maciça de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, aparelho de Golgi bem desenvolvido, de onde provêm muitos grânulos que ocupam mais de 50% do volume celular (WOODING, 1982). A grande maioria destas células contém dois núcleos, mas relata-se a presença de formas mono e trinucleares (KLISCH et al., 1999). Estes

autores propuseram o termo genérico de “células gigantes trofoblásticas” em quaisquer das ocorrências na placenta dos ruminantes, já que diferem apenas em número de núcleos. Algumas vezes podem apresentar lobulação nuclear, indicativo de sua origem a partir de mitoses abortivas, que foram bloqueadas antes do término da cariocinese.

Estas células não estão distribuídas de maneira uniforme pelo trofoectoderme, mas tendem á formação de pequenos agrupamentos (WOODING, 1984).

Apesar de estas células serem anatomicamente semelhantes nas regiões placentomais e interplacentomais, diferem na expressão do antígeno SBU3, o que somente ocorre nos placentônios (LEE et al., 1985), uma proteína específica da prenhez cujas concentrações plasmáticas permitem-nos a monitoração fetal (MAJEWSKA et al., 2005). Diferem ainda no tocante à capacidade de síntese seletiva e especialização funcional (WOODING et al., 1996).

A ocorrência de migração e a formação das placas sinciciais são sugestivas da promoção da redução da distância de difusão entre os capilares maternos e fetais, uma vez que as placas sinciciais são menores do que o epitélio uterino por elas substituído (WOODING, 1984)

A migração de células binucleadas, e a formação de células gigantes ou multinucleadas é acompanhada da degeneração de células epiteliais maternas, mortas possivelmente devido à alteração de seu ambiente local e não por efeito citolítico das binucleadas; as células mortas são subseqüentemente removidas por fagocitose do epitélio coriônico (WHATHES; WOODING, 1980; KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982). Esta destruição, remoção e remodelagem do componente materno é um processo normal durante o início da gestação em muitos ruminantes

(KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1980). A degeneração do epitélio uterino neste período é mais intensa em ovelhas do que em vacas, mas é observada no epitélio bovino entre os dias 20 e 27. Foram observadas vesículas de vários tamanhos (lisossomos) nas células colunares do cório bovino pelo dia 20, raras no epitélio uterino e nas células binucleadas do cório durante a adesão e fixação.

Os processos de migração e fusão mencionados são importantes mecanismos para a liberação de grânulos destas células no compartimento materno. Tais grânulos característicos das células binucleadas foram encontrados nas células maternas trinucleadas e nas placas sinciciais (WOODING, 1984), as quais participam na liberação destes conteúdos granulares próximo à circulação materna, alguns contendo lactogênio placentário (DUELLO; BYATT; BREMEL, 1986), envolvido na estimulação da morfogênese das glândulas endometriais produção de leite uterino e osteopontina pelo epitélio glandular durante a gestação em ruminantes, promovendo o desenvolvimento e crescimento fetais. A produção de hormônios como proteína-1 relacionada à prolactina (ANTHONY et al., 1995), glicoproteínas associadas à gestação (GREEN et al., 2000), estradiol (MATAMOROS et al., 1994) e progesterona (WANGO; HEAP; WOODING, 1991) foram igualmente a elas atribuídos. Todos eles são importantes fatores controladores da morfogênese caruncular e das glândulas uterinas e dos processos de diferenciação relacionados à nutrição fetal e sua sobrevivência intrauterina.

Células gigantes são normalmente derivadas de células mais genéricas, como as embrionárias, por exemplo, mas algumas parecem derivar de células relativamente diferenciadas da musculatura lisa e endotélio de artérias. O epitélio da superfície do endométrio e do pescoço das glândulas forma com frequência massas simplásmicas no período inicial de sua degeneração durante a gestação. Estes

simplasmas podem ser descritos como células gigantes multinucleadas. As células binucleadas de maior importância funcional são as de origem trofoblástica (MOSSMAN,1987)

O trofoblasto parece ser a única fonte extra-embrionária de células gigantes fetais. Uma de suas características é a poliploidia. Surgem durante o estágio de blastocisto (implantação) e continuam a crescer por toda a gestação. Normalmente desaparecem logo após o parto.

A multiplicação, aumento de tamanho e migração parecem ser contínuos.

Em ruminantes estas células contêm um ou dois núcleos, raramente três. Estão presentes no trofoblasto de todo o córioalantóide e durante os últimos dois terços gestacionais, também são encontradas nas criptas dos placentônios do epitélio uterino. Geralmente migram do trofoblasto para a superfície e epitélio das criptas.

Wooding (1984) demonstrou em ovelhas a fusão de células binucleadas trofoblásticas com células epiteliais uninucleadas, produzindo células trinucleadas híbridas. Esta fusão forma placas sinciciais que começam a repor o epitélio uterino das carúnculas ao redor do dia 20 pós-coito. À medida que os cotilédones aumentam, este sincício é mantido pela contínua migração das células binucleadas. As células gigantes de origem materna são resultado de processos degenerativos, especialmente do epitélio da superfície endometrial e das glândulas. A migração de células trofoblásticas ao endométrio ocorre em vários mamíferos, incluindo o homem.

Winsatt (1980) descreveu a existência de células binucleadas ou gigantes em todos os tipos de placentas cotiledonárias, ao longo da gestação, restritas ao cório na maior parte das espécies, tendo origem trofoblástica. Tais células são

morfologicamente semelhantes entre si nos ruminantes. Nos bovinos, as criptas das carúnculas, nas quais os vilos se estendem, são revestidas por um epitélio cúbico simples de origem materna, que pode ou não estar presente. Amplamente distribuídas no cório em ovelhas e vacas, são especialmente numerosas nas extremidades dos vilos ao final da gestação, estando em menor número no cório, entre as bases dos vilos (“zonas arcadas”) e na membrana coriônica. Nos bovinos só aparecem no trofoblasto ao final da implantação ou 17^o dia de gestação, sugerindo sua formação a partir da transformação das células ordinárias deste tecido. Figuras de mitose podem ser observadas. Há evidências morfológicas de que as células binucleadas são fagocitárias e com capacidade secretória proteolítica, posto que nas primeiras fases de formação do placentônio, quando o epitélio uterino e o tecido conjuntivo adjacente são destruídos e fragmentos celulares são internalizados pelo cório, foram encontrados pigmentos típicos das células epiteliais no interior delas, como também em outras células trofoblásticas. Isso ocorre igualmente nas zonas arcadas, ao final da gestação, quando da exposição direta destas células ao sangue materno (ingestão de eritrócitos maternos).

Flood (1991) observou que, em bovinos, as células binucleadas constituem aproximadamente 10% das células trofoblásticas do 18^o ao 20^o dia de gestação e 20% no restante do período, sendo que 20% delas apresentam capacidade migratória. Após migração elas aparecem no epitélio uterino, onde fundem-se às células epiteliais dando origem às células multinucleadas gigantes que compõem 50% do epitélio materno aos 24 dias de gestação. A atividade mitótica e o produto residual das células maternas nas vacas é menor que nas ovelhas, havendo total reconstituição do epitélio uterino no caminho de migração deixado pela célula trofoblástica nas primeiras. Próximo ao parto seu número cai para ¼ do seu total.

Gross, Williams e Russek-Cohen (1991), discutem o envolvimento das células binucleadas na liberação placentária. Tais células decrescem em número e viabilidade no momento do parto, possivelmente relacionado á expulsão completa da placenta, mediada pela ação de prostaglandinas e glicocorticóides.

Morgan e Wooding (1983) por método de criofatura (*freeze fracture*), estudaram a migração das células binucleadas na placenta de ovelhas. Observou-se que , ao longo de toda a gestação, as células do epitélio trofoblástico fundiam-se com o sincício que delimitava o tecido conjuntivo materno.

Marques Júnior, Andrade e Barreto Filho (1992) quantificaram células epiteliais coletadas nas criptas em três diferentes regiões, ápice, meio e base do útero em vacas e cabras. Nos bovinos o número decrescia muito próximo ao parto, diferentemente das últimas, que apresentaram sempre uma constância ao longo da gestação e um menor número total.

A avaliação da idade dos fetos apresenta interesse prático em caso de abortamentos, partos prematuros ou ainda em pesquisas científicas. Pode basear-se em modificações morfológicas observadas durante seu desenvolvimento, a saber, a posição e formação dos órgãos fetais, o peso fetal, o comprimento fetal, medindo-se a coluna a partir da articulação occipital até a primeira vértebra coccigiana, o aparecimento do revestimento piloso, o desenvolvimento dos órgãos fetais e da placenta e a quantidade de líquido fetal (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

3.3 FATORES RELACIONADOS A RETENÇÃO PLACENTÁRIA

A retenção é uma das mais comuns patologias placentárias. A incidência varia entre 3 e 12%, sendo maior nos animais que abortam ou têm crias prematuras ou em gestações gemelares ou partos induzidos.

A placenta bovina é normalmente expelida em 12 horas. A retenção primária das membranas fetais são decorrentes da falta de desprendimento das carúnculas maternas, enquanto que a retenção secundária está relacionada às dificuldades mecânicas em expelir membranas previamente desconectadas (atonia uterina). Ambos os mecanismos podem coexistir (EILER, 1997).

Para haver o desprendimento placentário deve haver antecipadamente uma progressiva colagenização do tecido conjuntivo placentomal, o achatamento do epitélio que reveste as criptas, alternância de condições isquêmicas e hiperêmicas durante a expulsão fetal levando à lesão do local de adesão dos epitélios materno e fetal, a total isquemia dos vilos fetais após a ruptura do cordão umbilical e, por último, contrações uterinas para promover o descolamento das membranas.

Em geral a retenção da placenta no gado não se deve à inércia uterina, mas à distúrbios neste processo de soltura. A não maturação dos placentônios é uma das causas mais importantes (JOOSTEN, 1992).

Durante a maturação normal antes do parto, o número de células binucleadas diminui drasticamente, o que não ocorre em caso de retenção (GROSS; WILLIAMS; RUSSEK-COHEN, 1991).

Barreto Filho e Marques Júnior (1993) coletaram placentônios durante várias fases gestacionais inclusive pós-parto e de várias regiões do útero (proximal, medial e distal). O número de células epiteliais maternas nas criptas carunculares tendeu a

uma diminuição com o avançar da prenhez, independente da região uterina, sugerindo sua relação com a liberação placentária. É possível que estas células apresentem capacidade de converter PGF2 α em PGE, mecanismo pelo qual a síntese de prostaglandinas é regulada pós-parto (BARRETO FILHO et al., 1995). Estes autores verificaram certa integridade do epitélio materno, com células aparentemente viáveis, áreas de retração anteriormente preenchidas por trofoblasto (diminuiu em tamanho e atividade), abundante proliferação de tecido conjuntivo e neoformação vascular.

Malard et al. (1996) em estudo semelhante com vacas zebu observaram um aumento relativo do epitélio trofoblástico e diminuição dos componentes estruturais maternos ao longo da gestação, relacionando o fato às modificações morfológicas referentes à maturação do placentônio para a liberação normal da placenta.

Santos et al. (1996) coletaram placentônios bovinos logo após o parto, separando animais com ou sem retenção placentária para estudo da proporção volumétrica dos diversos componentes estruturais, como tecido conjuntivo materno, epitélio das criptas carunculares, tecido conjuntivo fetal, epitélio trofoblástico e células binucleadas. Apenas a proporção destas últimas em fêmeas com retenção foi maior e significativa estatisticamente, sugerindo sua participação no processo.

Há sugestões de um papel central na histocompatibilidade desencadeando uma reação imunológica que contribui para a liberação placentária, com o envolvimento de antígenos MHC de classe I em áreas intercotiledonárias e na zona arcada do placentônio a partir do sexto mês gestacional (DAVIES; FISHER; SCHLAFER, 2000).

Compararam-se índices e resistência à retenção de placenta em búfalas e fêmeas bovinas da raça Nelore e observou-se índices de retenção de 4.55% para

búfalas e de 1.25% para animais Nelore PO. No tocante às búfalas, houve maior intervalo entre partos (491 dias, contra 422.5, sem retenção) e alteração do período de serviço em animais com retenção (181 dias contra 180.54). Além disso, observou-se uma tendência à ocorrência de recidivas quanto maior o número de partos, para ambas as espécies (NAVARRO, 2002).

O índice de retenção encontrado para a raça Nelore foi considerado baixo, em relação à dados na literatura, enquanto que nos búfalos, o índice encontrado é tido como razoável, em acordo com achados literários prévios, mas estes animais, diferentemente dos Nelore, não mostraram-se resistentes à retenção de secundinas, haja vista a semelhança dos valores encontrados para bovinos leiteiros. Isso parece ocorrer devido ao tipo de criação e exploração semelhantes.

No que se refere aos possíveis patógenos envolvidos no processo, doenças infecciosas produtoras de lesões macroscópicas uterinas evidentes são decorrentes de infecções bacterianas e doenças fúngicas crônicas (SCHLAFER, 2000).

3.4 APOPTOSE

Células mortas ou em processo de morte são comuns em tecidos; a morte de células isoladas em tecidos normais pode ser parte da renovação celular durante a involução do tecido, como parte do desenvolvimento embrionário normal ou como parte de modificações cíclicas em tecidos e órgãos, podendo ainda ocorrer em condições patológicas. Todos os exemplos de morte de uma célula isolada são conhecidos como apoptose porque embora ocorram em resposta à uma ampla gama de disparadores, parece ser um mecanismo comum de morte celular e com aspecto microscópico característico.

Difere da necrose, que é sempre patológica, acompanhada de reação inflamatória e caracterizada pela inabilidade das células em produzir ATP necessário para manter a homeostasia tissular.

A apoptose é um processo ativo que necessita gasto energético. Quando ocorre durante o desenvolvimento do embrião ou feto, denomina-se morte celular programada, destacando seu caráter inevitável e controle genético.

O disparador da apoptose pode ser a ligação de uma molécula sinalizadora a um receptor de membrana, ou a falta de um sinal particular necessário para bloqueá-la. Dentro do núcleo alguns produtos gênicos inibem (Bcl-2) ou estimulam (p53) o processo, de acordo com suas interrelações e influências de outros reguladores.

Após a ativação ocorrem várias modificações celulares visíveis ao M.O., como por exemplo a condensação da cromatina nuclear (picnose), formando uma ou mais massas escuras, justapostas à membrana nuclear. Simultaneamente a célula afasta-se de suas vizinhas pela perda dos dispositivos de aderência, e a eosinofilia do citoplasma aumenta. Nesta fase as organelas citoplasmáticas ainda estão preservadas. A seguir o material nuclear se fragmenta (cariorréxis), acompanhada da dissolução da membrana nuclear. Vesículas citoplasmáticas se destacam da superfície celular e toda a célula pode vir a fragmentar-se (cariólise), originando fragmentos envolvidos por membrana, alguns dos quais contendo material nuclear (corpúsculos apoptóticos), que podem ser fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas (YOUNG; HEATH, 2001).

A apoptose é ativada por um conjunto de genes que codificam proteínas essenciais para a morte da célula, como endonucleases e proteases. A ativação pode envolver mecanismos moleculares, dependendo da supressão de fatores

tróficos oriundos de células vizinhas, como fatores de crescimento, ou distantes, como hormônios (ROBERTIS; HIB, 2001).

O estágio final da injúria celular, causada por danos mecânicos ou toxicológicos, é conhecido como morte celular, podendo dever-se a acidentes, como falhas no suprimento sangüíneo, ação de células “ T killer”, especializadas para este fim, ou ainda por suicídio, este último passível de acontecer a qualquer tipo celular, sendo necessário apenas o recebimento de um sinal apropriado, após o qual a célula simplesmente o obedece cegamente, ativando mecanismos que a levarão à auto-destruição. Esta última modalidade é denominada apoptose, envolvendo sempre a retração celular.

O diagnóstico de morte celular é passível de ser feito baseado em fatores morfológicos, como a fragmentação nuclear, e também funcionais, mediante o aumento da permeabilidade de membrana. Apesar da dificuldade existente em detectar-se células que estão morrendo ou que acabaram de morrer, aquelas que sofrem apoptose podem ser identificadas em cortes de tecido, através da identificação de mudanças nucleares distintas e da utilização de métodos imunistoquímicos, relacionados à patologia molecular. (MAJNO, G., JORIS, I., 1996). Segundo Van Cruchten e Van Den Broeck (2002), entretanto, muitas destas técnicas são consideradas inespecíficas.

A apoptose é, portanto, uma forma de suicídio celular, ocorrendo a partir de processos como embriogênese, crescimento, atrofia, injúria tóxica, infecções virais, respostas imunológicas, tumores. É entendida como um componente essencial para a vida, uma força igual e oposta à mitose (BOWEN, 1993; MAJNO; JORIS, 1996).

Uma vez que as células destinadas à morte pereçam para que as demais sobrevivam, pode-se dizer que protagonizam uma espécie de suicídio biológico com fins altruístas (ROBERTIS; HIB, 2001).

As primeiras observações de apoptose, ainda não com esta terminologia, foram feitas em 1885, por Flemming, em estudos com folículos ovarianos em regressão (BONINI, 2000).

A descoberta do fenômeno foi realizada por Carl Vogt, em 1942 (PETER; HEUFELDER; HENGARTNER, 1997).

O termo morte celular programada foi introduzido em 1964 por Lockshin, propondo que a morte da célula durante o desenvolvimento não ocorre acidentalmente, mas segue uma seqüência de passos controlados levando à autodestruição (GEWIES; GRIMM, 2003).

O termo apoptose foi utilizado para descrever os processos fisiológicos que levam à autodestruição celular controlada, por Kerr, Wyllie and Currie em 1972. A origem da palavra é grega, e significa diminuição/redução (*falling off* ou *dropping off*), em analogia às folhas e pétalas que caem, enfatizando o caráter fisiológico e a relação entre vida e morte que faz parte do ciclo celular. A apoptose é a forma mais freqüente forma de morte celular programada, mas existem outros tipos de formas de morte programada não-apoptóticas e de importância biológica (LEIST, 2001).

Na década de 70, mais precisamente entre 1962 e 1964, John Kerr observou padrão de morte celular diferente da necrose, com um modelo experimental de atrofia isquêmica do fígado de ratos, através da ligadura parcial da veia porta; nos lóbulos atroficos sem inflamação havia a presença de pequenos corpúsculos citoplasmáticos arredondados, alguns contendo cromatina condensada

com preservação de lisossomos. Devido à sua natureza não-degenerativa, foi denominada necrose de encolhimento (*shrinkage necrosis*) (KERR, 2002)

O conceito de apoptose nasceu na Austrália, em 1971 - 1972, sendo descrita por Kerr, Wyllie e Currie, os quais detectaram mudanças morfológicas em células sofrendo desintegração celular e digestão macrofágica das pequenas vesículas resultantes. As células desintegradas tinham o aspecto de folhas caídas ao redor de uma árvore, sendo a partir daí adotado o nome grego “apoptosis” para descrever o processo de morte celular, geneticamente determinado, que desempenha um papel crucial na homeostase tecidual, como contrabalanço para a proliferação celular (do grego *apó*, separado de, e *ptôsis*, caída (ROBERTIS; HIB, 2001; MARGARETH; WINKERFORD; WALKER, 1997).

Ultraestruturalmente, os sinais mais precocemente reconhecíveis de apoptose envolviam a condensação do citoplasma e da cromatina nuclear e agregação da cromatina compactada abaixo do envelope nuclear. Pequenos corpos arredondados compreendiam massas ligadas por membranas de cromatina condensada, nas quais as organelas estavam preservadas. Muitos deles continham fragmentos de núcleos, nos quais a compactação da cromatina persistia. Observou-se a fagocitose e a digestão dos corpúsculos pelos hepatócitos e células mononucleares fagocitárias. Os corpúsculos extracelulares apareciam em grupos, sugerindo que sua formação envolvia o brotamento a partir da superfície das células em condensação (KERR, 2002). A classificação bioquímica e morfológica da apoptose foi dada por Kerr, Wyllie e Currie (1972), ajudando a esclarecer e definir seu papel fisiológico. (AMARANTES-MENDES, 2003).

Em muitas situações fisiológicas a homeostase é mantida pela morte da célula. Também promove a destruição de células que representem ameaça à

integridade do organismo. Além de ser disparada através dos receptores de morte, também pode ser iniciada por uma série de insultos capazes de danificar o DNA, como irradiações X e raios ultravioletas, quimioterápicos e várias toxinas. Proteínas sensíveis aos danos causados ao DNA ajudam a disparar a apoptose; elas também afetam o ciclo celular, parando a divisão celular para que o dano seja reparado ou decidindo pela morte celular quando de uma grande injúria.

A denominação “morte celular programada” nos remete ao conceito que muitos tipos celulares são “programados” para a morte, a não ser que sejam preservados por fatores de crescimento específicos e/ou de sobrevivência. Entretanto, este termo refere-se ao mecanismo, propriamente dito, enquanto que o termo apoptose está ligado ao padrão morfológico celular. Diz-se também “programado” por ser um padrão de eventos bastante ordenado.

(<http://morpheus.fmrp.usp.br/biocell/introapoptose.htm>, 13/12/2002)

Na sua definição original, apoptose é mais corretamente definida de acordo com as mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem nas células que estão morrendo. O autor sugere que este termo seja usado dessa forma e que as vias sejam claramente distingüidas por terminologias alternativas, referindo-se apenas aos produtos finais das vias de morte celular, posto que estas podem ser programadas ou não-programadas (EASTMAN, 1993).

É importante atentar para a diferenciação que há entre os diversos tipos de morte celular, sobretudo a necrose.

A morte causada por injúria é caracterizada por um aumento do volume celular e perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, seguida de uma desorganização citoplasmática e dissolução nuclear foi definida como necrose, enquanto que a apoptose foi tida como a morte fisiológica da célula,

caracterizada pela condensação da cromatina, degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais, perda do volume e aumento da granulosidade celular, manutenção das estruturas das organelas, formação de “pregas” na membrana plasmática e fragmentação celular em corpúsculos apoptóticos. Este termo é associado a um outro, “suicídio celular”, sob um ponto de vista altruístico, pois é a própria célula que desencadeia a cascata de eventos bioquímicos, para a continuidade da vida do organismo e perpetuação da espécie. A mudança responsável pelo reconhecimento e eliminação das células em apoptose parece ser a externalização de resíduos de fosfatidilserina, normalmente encontrados na face interna da membrana celular, evento este também caspase-dependente (AMARANTES-MENDES, 2003).

As células que morrem acidentalmente, como resultado de injúria aguda, liberam seus conteúdos citossólicos no espaço extracelular, induzindo à uma resposta inflamatória; já as células apoptóticas desaparecem, de modo mais eficiente para o organismo, sendo fagocitadas por macrófagos ou por células vizinhas de forma tão rápida que não há inflamação; no interior dos macrófagos a maquinaria celular é desmontada e seus blocos de constituintes químicos são reutilizados. Devido à rapidez com que ocorrem os fenômenos, a morte da célula praticamente não é notada.

(<http://morpheus.fmrp.usp.br/biocell/introapoptose.htm>, 13/12/2002)

A apoptose ocorre em células isoladas, enquanto a necrose envolve grupos de células; além disso, na necrose há produção de exsudato celular, inflamação, edema, danos para as organelas e membrana celular, a cromatina é fragmentada aleatoriamente, há destruição dos canais iônicos e ativação de enzimas lisossomais (HARRISON, 1988).

A necrose é um processo passivo e degenerativo, que faz a célula tornar-se hipotônica, favorecendo a entrada de água e promovendo a ruptura da membrana plasmática, com a liberação de seus componentes e dissolução nuclear. A morfologia das células necróticas é variável, e a terminologia é utilizada para mudanças ocorridas após a ruptura da membrana plasmática (MAJNO; JORIS, 1995). Algumas das alterações observadas são a manutenção do contorno nuclear, agrupamento da cromatina apesar de seu contorno mal definido, cariólise com o desaparecimento da cromatina (evento que precede a fagocitose), edemaciação das mitocôndrias e surgimento de densidades ficiais em sua matriz, e, por último, ruptura das membranas plasmáticas interna e externa, levando à total dissolução dos componentes celulares (KERR et al., 1987).

Caso o estresse celular seja muito violento, haverá morte por necrose; pode ocorrer que, quando de um estresse mais ameno, o sinal gerado seja analisado pelas mitocôndrias, que podem decidir sobre a sobrevivência da célula, liberando ou não o citocromo c (para a ativação da cascata de caspases), por exemplo (AMARANTES-MENDES, 2003).

No que se refere à morfologia da célula apoptótica, à microscopia de luz, o reconhecimento da apoptose depende principalmente da observação de corpúsculos apoptóticos. A maioria deles é de formato circular ou oval; os menores são de difícil acesso, a não ser que contenham uma pequena mancha de cromatina condensada em seu interior. A segregação desta cromatina que é vista em fragmentos apoptóticos nucleares na microscopia eletrônica só pode ser evidenciada sob microscopia de luz em cortes de tecidos mais finos. Normalmente ficam agrupados, mas podem ser vistos isoladamente. Quando de tecidos em blocos de parafina, devido ao natural encolhimento das células causado pelo

processo de inclusão, há o desenvolvimento de espaços ao redor dos corpúsculos apoptóticos extracelulares. É difícil de determinar se o corpúsculo apoptótico é extracelular ou já foi fagocitado utilizando-se microscopia de luz (KERR et al., 1995).

Os corpúsculos apoptóticos que derivam de células com uma alta proporção núcleo:citoplasma normalmente compreendem massas únicas de cromatina picnótica margeadas por citoplasma. Quando a célula apoptótica apresenta um grande citoplasma, a maioria dos corpúsculos contém apenas pequenas manchas de cromatina picnótica e alguns são desprovidos de componentes nucleares (KERR et al., 1987)

O processo de fagocitose e digestão dos corpúsculos pelas células adjacentes permite que estes sejam visualizados histologicamente apenas por algumas horas (WYLLIE et al., 1980); além disso, seu pequeno tamanho e a ausência de inflamação causam dificuldades adicionais. Por estas razões, a quantificação de apoptose em tecidos é de difícil acesso.

Descobriu-se que as modificações nucleares típicas que ocorrem na apoptose estão associadas a um tipo definido de quebra do DNA; tais características podem ser resumidas em etapas: 1. a célula encolhe e seu citoplasma torna-se denso; 2. a cromatina agrega-se formando densas massas bem definidas de encontro à membrana nuclear; 3. o núcleo pode, eventualmente, fragmentar-se (cariorréxis); 4. as células emitem protrusões que tendem a quebrar-se, dando origem à pequenos corpúsculos apoptóticos, eosinofílicos, contendo ou não fragmentos nucleares; 5. macrófagos ou células vizinhas fagocitam os debris; 6. clivagem do DNA. O processo é dinâmico, ocorrendo dentro de poucas horas (MAJNO; JORIS, 1996).

A descrição dos eventos também pode ser feita por: diminuição do tamanho das células; clivagem das mitocôndrias com a liberação do citocromo c;

desenvolvimento de bolhas na sua superfície (*blebbing*); degradação da cromatina nuclear; a célula se quebra em pequenos fragmentos envolvidos em membrana celular; o fosfolípido fosfatidilserina, o qual fica normalmente escondido na membrana plasmática, é exposto na superfície da célula; as células ligam-se por receptores aos macrófagos e células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos, para que ocorra a fagocitose. Por fim, as células fagocíticas secretam citocinas, que inibem o processo inflamatório.

A formação de corpúsculos apoptóticos impede o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular impedindo a resposta inflamatória (HARRISON, 1988).

De acordo com Van Cruchten e Van den Broeck (2002), a apoptose é marcada por redução celular, condensação e marginalização da cromatina com enrugamento da membrana plasmática; eventualmente a célula divide-se em corpúsculos apoptóticos, que consistem em organelas celulares e/ou material nuclear, envolvidos por uma membrana plasmática intacta, os quais serão engolfados por células vizinhas ou, principalmente, por macrófagos, através do reconhecimento dos fragmentos celulares pela expressão da fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática destas células (FADOK et al., 1992). Picnose e cariorréxis também são observáveis (SANDERS; WRIDE, 1995).

Três mecanismos são de fato reconhecidos por estarem envolvidos no processo apoptótico: um deles mediado por um receptor ligante, uma via mitocondrial, e um último no qual o retículo endoplasmático assume papel central. Todos eles ativam caspases, que são responsáveis pelas modificações morfológicas observadas durante a apoptose (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002).

Existem moléculas que se ligam à receptores específicos na superfície celular e sinalizam a célula para que se inicie o programa de apoptose. Estes “ativadores da morte” incluem: TNF- α (*tumour necrosis factor*) ou fator de necrose tumoral α , que se liga ao receptor TNF; TNF- β , uma linfotóxina, que também se liga ao receptor TNF; FasL, ou ligante Fas, uma molécula que se liga ao receptor Fas, também chamada CD95. O Fas é um membro da família dos receptores de TNF e seu ligante é uma citocina associada à membrana de TNF, o qual é produzido pelas células do sistema imune.

Os mecanismos pelos quais a célula pode suicidar-se podem ser gerados por sinais que chegam ao interior da célula, disparados pelos “ativadores da morte” que se ligam a receptores na superfície celular (TNF- α , linfotóxina TNF- β e FasL) ou ainda disparados por deletérias espécies reativas ao O_2 (radicais livres, por exemplo). Os mecanismos regulatórios que desencadeiam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular e o sinal para o suicídio freqüentemente provém do exterior, por meio destes receptores de superfície (LEHNINGER, 2002).

Os receptores de morte pertencem à superfamília de genes TNF (fator de necrose tumoral), definida por semelhantes domínios extracelulares ricos em cisteína (SMITH, BAKER, SYMONDS, 1994).

Esses receptores possuem sítios de ligação ao TNF na face externa da membrana plasmática e um “domínio de morte” de cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que passa o sinal de autodestruição através da membrana plasmática às proteínas citosólicas como o TRADD (domínio da morte associado ao receptor TNF (*TNF receptor- associated death domain*); um outro receptor, Fas, possui um domínio de morte semelhante que interage com a proteína citosólica FADD (*Fas-*

associated death domain), ativando uma protease citosólica chamada de caspase-8. As porções citoplasmáticas desses receptores compartilham um domínio de morte, que promove a interação proteína-proteína. As proteínas adaptadoras que interagem com os domínios de morte nas caudas citoplasmáticas do Fas e TNFR-1 são chamadas de FADD e TRADD, respectivamente, as quais interagem por meio de diferentes regiões com a caspase-8, cujo domínio carboxi-terminal é uma pró-caspase (forma inativa da caspase) (JANEWAY, 2000). A ligação promove a atividade enzimática da caspase-8, levando à cascata das proteases, ou seja, ao serem ativadas pelos respectivos receptores, as proteínas citadas estimulam uma família de proteases citossólicas denominadas caspases (*Cysteiny/ ASPartate proteinASES*), conhecidas também pela sigla ICE (*interleucin-1 β converting enzymes*). São elas que desencadeiam a apoptose. O processo de apoptose também pode ser desencadeado automaticamente, no caso de tipos celulares com vida curta (ROBERTIS; HIB, 2001).

As caspases ativadas, portanto, clivam e inativam uma sucessão de caspases. No final dessa via uma DNase ativada por caspase (CAD) entra no núcleo e cliva o DNA, produzindo fragmentos característicos de uma célula apoptótica (JANEWAY, 2000).

A apoptose pode ser disparada por sinais internos, envolvendo a via mitocondrial ou intrínseca, iniciada pelo aparecimento de sinais de estresse, vindos da própria célula, como radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, poucos nutrientes, excesso de espécies reativas de oxigênio e corticosteróides, entre outros mecanismos. Tais sinais são detectados pelas mitocôndrias, centro de decisões sobre a vida e morte celular; caso penda para a morte, as mitocôndrias sofrerão um desacoplamento da cadeia

respiratória e irão liberar para o citosol o citocromo c e proteínas SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point*) e AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*). O citocromo c citoplasmático liga-se à APAF-1 (molécula homóloga ao Ced-4) e, na presença de ATP, ativam a caspase 9, a qual irá ativar a caspase 3. O complexo constituído por citocromo c, APAF-1, ATP e caspase 9 é chamado “apoptossomo executor”. A proteína SMAC, por sua vez, é responsável pelo cancelamento da ação negativa das IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) sobre a apoptose (AMARANTES-MENDES, 2003).

Em outras palavras, numa célula saudável a membrana externa de suas mitocôndrias expressa a proteína integral Bcl-2 na superfície, originária do proto-oncogene humano localizado no cromossomo 18, o qual mediante mutação ou expressão inapropriada pode fazer com que a célula torne-se cancerosa. Esta proteína também pode estar presente nas membranas do retículo endoplasmático e no núcleo.

A Bcl-2 liga-se à uma molécula da proteína Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) ou fator de ativação da protease apoptótica, produzida pelo gene Apaf-1, que ativa a procaspase-9 no citocromo c. Quando a Bcl-2 libera Apaf-1 decorrente a um dano celular interno, uma proteína relacionada, Bax, penetra nas membranas mitocondriais promovendo o extravazamento do citocromo c, que ao ser liberado, vai ligar-se, juntamente com a Apaf-1 à moléculas da caspase- 9. O complexo resultante da união do citocromo c, Apaf-1, caspase- 9 e ATP é chamado de apoptossomo.

A caspase -9 pertence à uma família de mais de uma dúzia de caspases, que são enzimas proteases, sintetizadas como proenzimas inativas, possuidoras de um

resíduo crítico de Cys (cisteína) no sítio ativo e capazes de clivar cisteínas (proteínas) e, muitas vezes, umas às outras, hidrolizando suas proteínas-alvo no lado carboxi-terminal de resíduos específicos de Asp (ácido aspártico) (LEHNINGER, 2002). Uma vez ativada a caspase-9, há a ativação das demais caspases, de modo seqüencial, levando à digestão de proteínas estruturais no citoplasma, à degradação de DNA cromossômico e à fagocitose da célula.

A via extrínseca que inicia o processo é disparada pela ligação de receptores localizados na superfície da célula, os “receptores de morte”(Death Receptors, DR), cuja família é composta por moléculas como Fas (CD95), TNFR-1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Após estimulação, recrutam proteínas adaptadoras, como FADD, que se associam a eles as caspases -8 ou -10. O complexo formado por estas caspases, o receptor de morte e as moléculas adaptadoras é chamado de “apoptossomo iniciador”. Na seqüência, caspases executoras são ativadas pelas iniciadoras ou estas últimas irão gerar sinais que irão acoplar-se à via extrínseca atingindo bioquimicamente o conjunto de mitocôndrias. A formação do apoptossomo iniciador pode ser bloqueada por um competidor da ligação entre as caspases iniciadoras e moléculas adaptadoras, o FLIP, que tem alta homologia estrutural com as caspases, mas o sítio catalítico é inativo (AMARANTES-MENDES, 2003).

Ao nível da mitocôndria a liberação de citocromo c é controlada principalmente pelas proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax), onde há membros homólogos ao gene *egl-1* (pró-apoptóticos) e ao gene *Ced-9* (antiapoptóticos), que exercem regulação mútua (AMARANTES-MENDES, 2003).

Ainda há uma terceira via de autodestruição que não se utiliza das caspases e envolve a proteína AIF ou fator indutor de apoptose, normalmente situada no espaço intermembranoso da mitocôndria. Quando da sinalização negativa, este fator

é liberado da mitocôndria (como na liberação do citocromo c, na primeira via), vai ao núcleo e liga-se ao DNA, ativando sua destruição e a morte celular.

(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>,

25/06/2003)

Baseando-se nos estudos com *C. elegans*, três produtos de genes são essenciais para a apoptose: Ced-3 e Ced-4 promovem apoptose, enquanto que Ced-9 a inibe. Ced-3 é uma caspase, ou seja, uma cisteína protease que cliva algumas proteínas após resíduos específicos de ácido aspártico, existindo como um zimógeno, o qual é ativado através de auto-clivagem. O Ced-4 liga-se ao Ced-3 e promove sua ativação, enquanto que Ced-9 liga-se ao Ced-4 evitando que este ative o Ced-3. Normalmente, Ced-9 forma um complexo com os outros dois genes, o que mantém Ced-3 inativo. Estímulos para apoptose provocam a dissociação do Ced-9, permitindo a ativação de Ced-3 e a ocorrência da morte da célula (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). As caspases dos mamíferos são semelhantes ao Ced-3 (THORNBERRY; AZEBNIK, 1998), sendo que Apaf-1 é o único homólogo ao Ced-4 descrito em mamíferos (ZOU et al., 1997). Os produtos da família Bcl-2 em mamíferos são relacionados ao Ced-9, mas incluem ainda subgrupos de proteínas que podem tanto inibir quanto promover o processo apoptótico (GREEN; REED, 1998). Nem sempre a inibição das caspases pode inibir a morte celular induzida por um estímulo pró-apoptótico.

Proteínas pró-apoptóticas como Bax, que têm como alvo as membranas mitocondriais, podem induzir dano e apoptose mesmo quando as caspases são inativadas (XIANG et al., 1996), sugerindo que há um mecanismo caspase-independente para a morte celular programada e envolvendo a mitocôndria.

3.4.1 Caspases

As modificações morfológicas que ocorrem na célula são fruto de eventos bioquímicos complexos promovidos por uma família de cisteína-proteases denominadas caspases. Pouco se sabe sobre a regulação das caspases mas alguns princípios básicos são importantes para o entendimento de sua biologia: a proteólise é um fenômeno irreversível, sendo que a regulação das proteases se limita ao controle de sua atividade e da disponibilidade de substratos, posto que não há como voltar atrás após a clivagem de uma proteína. A maioria das proteases é sintetizada como precursoras, com pouca ou nenhuma atividade catalítica, sendo convertidas em enzimas ativas por proteólise e podendo ser acumuladas na célula sendo ativadas *a posteriori*. As proteases são capazes de regular sua própria ativação, através de *feedbacks* negativos e positivos, sendo que a protease ativa pode direta ou indiretamente ativar seu próprio precursor, o que garante sua rápida atuação. Há inibidores que regulam a concentração de proteases ativas na célula estabelecendo um limiar, o que evita uma ativação espontânea e uma morte indesejável; a especificidade das proteases é determinada pela combinação das estruturas primária, secundária e terciária dos substratos proteicos, os quais são limitados (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

O fenótipo da apoptose é semelhante, mesmo em situações fisiológicas distintas; isso é decorrente da ação em cascata de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominada Caspases (*Cysteine ASPartASES*), possuidoras de um domínio catalítico QACXG, onde a cisteína é o aminoácido ativo.

As caspases importantes no processo pertencem a dois grupos distintos, as executoras, que promovem o processo, e as iniciadoras, do qual fazem parte as

caspases -8, -10 e -9 e talvez a -2, responsáveis pela ativação das executoras; quanto à estas, a principal é a caspase-3, que, entre outras funções, cliva a subunidade inibitória do DFF (*DNA fragmentation factor*) ou ICAD, liberando a subunidade ativa desta molécula (CAD ou *caspase-activated DNase*), cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA, ferando fragmentos oligonucleossomais. Outros substratos são as proteínas do citoesqueleto, como a fodrina, gelsolina, plectina, e a citoqueratina, cuja proteólise altera a morfologia celular. As caspases executoras são, além da caspase-3, as caspases -6 e -7 (AMARANTES-MENDES, 2003).

As caspases foram implicadas na apoptose quando da descoberta da relação entre o Ced-3 e a enzima interleucina 1 β -conversora (ICE ou caspase-1) em mamíferos. Apesar da caspase-1 não ter importância na apoptose, foi o primeiro membro da família de proteases ligada aos fenômenos de inflamação e morte celular a ser identificado. Na apoptose podem agir como executoras (promovendo a desagregação celular propriamente dita), ou como iniciadoras (responsivas aos sinais pró-apoptóticos e desencadeadoras desta desagregação).

As caspases são semelhantes quanto à sequência de aminoácidos, estrutura, e especificidade ao substrato (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). São expressadas como proenzimas (zimógenos de 30 a 40 kD), formadas por um domínio NH₂ terminal, uma sub-unidade maior (aproximadamente 20 kD) e outra menor (aproximadamente 10 kD). A ativação envolve proteólise entre os domínios, seguida da união das duas sub-unidades formando um heterodímero. No caso da caspase-1 e -3, dois heterodímeros associam-se, formando um tetrâmero, com dois sítios catalíticos independentes (WALKER et al., 1994). Dentro de cada domínio catalítico ambas sub-unidades estão intimamente associadas, contribuindo com

resíduos necessários para a ligação do substrato e catálise. Tanto o domínio NH₂ terminal quanto todos os demais domínios, derivados da proenzima por clivagem das caspases são fundamentais para a regulação da ativação e atuando na cascata apoptótica ou autocatálise, respectivamente. Devido à sua alta especificidade, a clivagem se dá sempre após o ácido aspártico. Esta exige ainda o reconhecimento de 4 aminoácidos NH₂ terminal; além disso, nem todas as proteínas que contêm a sequência ótima do tetrapeptídeo são clivadas, o que implica na influência conjunta dos elementos estruturais terciários no reconhecimento do substrato. Existe, de fato, uma seleção das proteínas a serem clivadas, de maneira coordenada, num sítio específico, o que resultará na perda ou modificação funcional (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

As caspases executoras são tidas como as responsáveis pelas modificações celulares na apoptose; um dos papéis das caspases é o de inativar proteínas que mantêm a célula viva, como a ICAD/DFF45 (LIU et al., 1997), que é uma inibidora da CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*), uma nuclease responsável pela fragmentação do DNA, a qual também não se apresenta na forma ativa se sintetizada na ausência de sua inibidora (ICAD).

Outros reguladores negativos da apoptose clivados por caspases estão na família das proteínas Bcl-2 sendo que sua clivagem parece não somente inativá-las, como também produzir fragmentos promotores da apoptose.

As caspases promovem a desagregação celular destruindo a lâmina nuclear, uma estrutura rígida situada abaixo da membrana nuclear, formada por lamininas, ligada à organização da cromatina.

A reorganização de estruturas celulares é também feita de forma indireta, mediante clivagem de várias proteínas do citoesqueleto, como a gelsolina, a FAK

(quinase de adesão focal) e PAK2 (p21-quinase ativada 2); a clivagem destas proteínas desregula seu processo de ativação (KOTAKHOTA et al., 1997; RUDEL; BOKOCH, 1997).

As caspases também podem promover a inativação ou desregulação de proteínas ligadas a reparos do DNA e à sua replicação, e à união/acoplamento do RNA mensageiro, levando, indiretamente, à morte celular, uma vez que afetam a homeostase e reparo celular.

É importante lembrar que as caspases atuam de modo organizado e seqüencial, fazendo com que a célula perca contato com suas vizinhas, reorganizando o citoesqueleto, brecando replicação e reparo do DNA, interrompendo a união do RNA mensageiro, promovendo a destruição do DNA, rompendo a estrutura nuclear, induzindo a produção de sinais para ocorrência de fagocitose e, finalmente, levando à desintegração celular e formação dos corpúsculos apoptóticos.

A regulação do processo envolve a interação de dois tipos de caspases, as iniciadoras e as executoras. Algumas das primeiras (caspase-8, -9 e -10) recebem um sinal pró-apoptótico e são ativadas passando este sinal para as executoras (caspases-3, -6 e -7), dentre as quais supõe-se que a caspase-3 seja a primeira executora (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 2001).

3.4.2 CITOQUERATINA, CITOESQUELETO E APOPTOSE

O citoesqueleto celular é composto por uma rede de sustentação formada por filamentos e túbulos bastante pequenos. Contém elementos estruturais de 3 tipos principais: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, bem como proteínas acessórias responsáveis pela ligação dessas estruturas entre si, à

membrana plasmática e às membranas das organelas celulares. Os filamentos intermediários possuem de 10 a 15 nm de diâmetro, apresentando tamanho intermediário entre os microfilamentos e os microtúbulos. Estas proteínas têm uma função puramente estrutural e são constituídas por filamentos protéicos que formam filamentos maiores e ligam estruturas intracelulares entre si e às proteínas da membrana plasmática. Há mais de 50 tipos no ser humano. Os filamentos intermediários de citoqueratina são característicos das células epiteliais, onde formam uma rede de sustentação no interior do citoplasma e se ancoram à membrana celular em junções intercelulares. Outros exemplos são a vimentina, a desmina, proteínas dos neurofilamentos e a proteína ácida fibrilar glial (YOUNG; HEATH, 2001).

Os elementos do citoesqueleto estão ligados uns aos outros, à membrana plasmática e às membranas das organelas citoplasmáticas por uma variedade de proteínas de ligação. Os filamentos intermediários desempenham uma função de sustentação e estática.

As funções do citoesqueleto são sustentação estrutural para a membrana plasmática, organelas celulares e alguns sistemas de enzimas do citosol; promove movimento de organelas intracelulares, membranas plasmáticas e outros constituintes do citosol; locomoção para os movimentos amebóides e estruturas móveis especializadas (cílios e flagelos); contratilidade de células de tecidos especializados, como o muscular (YOUNG; HEATH, 2001).

A apoptose de células epiteliais apresenta problema significativo na disposição dos componentes dos filamentos intermediários do citoesqueleto, os quais são altamente polimerizados e são relativamente insolúveis em soluções aquosas normais (CAULÍN; SALVESEN; OSHIMA, 1997). O processo se caracteriza

por modificações ultraestruturais que incluem a ruptura do esqueleto de actina, além da formação de bolhas na membrana, diminuição na adesão e contato intercelular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e “empacotamento” dos fragmentos em corpúsculos apoptóticos envolvidos por membrana nuclear (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980). As chamadas queratinas ou citoqueratinas 8 e 18 são os principais componentes dos filamentos intermediários das células epiteliais simples e dos tumores que delas derivam. Durante a apoptose os filamentos intermediários da citoqueratina 18 reorganizam-se em estruturas granulares devido a fosforilação desta em serina 53. A citoqueratina 18 libera um fragmento proteolítico que migra juntamente com a citoqueratina 18 clivada até caspases executoras. A caspase 3 cliva o fragmento 22-kD num fragmento 19-kD. A caspase 3 cliva a subunidade inibitória do DFF (*DNA fragmentation factor*), também chamada iCAD, liberando a subunidade ativa desta molécula (CAD; *caspase-activated DNase*), cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA, gerando os fragmentos oligonucleossomais característicos da apoptose. Outros substratos importantes incluem proteínas do citoesqueleto, tais como fodrina, gelsolina, plectina, além da citoqueratina, cuja proteólise pelas caspases pode contribuir para o aparecimento das modificações na estrutura morfológica celular (AMARANTES-MENDES, G., 2003). A citoqueratina 18, a qual possui larga distribuição nos trofoblastos da placenta (AUSTGULEN et al., 2002), quando da clivagem dá origem à dois resíduos conservados de aspartato (CAULIN; SALVESEN; OSHIMA, 1997) e há anticorpos que podem reconhecer tais fragmentos produzidos pelas caspases, marcando seletivamente células pré-apoptóticas e apoptóticas (BANTEL et al., 2001).

Anticorpos foram desenvolvidos para interagir com a citoqueratina 18 e um deles é o M30, o qual reconhece células epiteliais apoptóticas. Esta observação

levou á identificação do sítio de clivagem da caspase na citoqueratina 18 e à caracterização de um neoepítopo que é exposto durante a apoptose (LEERS et al., 1999). Da mesma forma, estudos foram realizados com anticorpos anti caspase-3 clivada, permitindo o acesso a tais neoepítopos (GOWN; WILLINGHAM, 2002).

As queratinas são proteínas epitélio-específicas dos filamentos intermediários e são subdivididas em tipo I e II. Contêm um domínio central α -hélice (*central alpha helical rod domain*) e outros domínios não- α hélices, NH₂-terminal (*head*) e COOH terminal (*tail*). Estes dois últimos contêm os sítios para muitas das modificações pós-translacionais, inclusive fosforilação e glicosilação (OMARY et al., 1998). São moléculas altamente dinâmicas e reorganizam-se durante diferenciação, mitose e apoptose (SCHUTTE et al., 2004). Na apoptose há total reorganização do citoesqueleto (VAN ENGELAND, 1997). Muitos dos componentes citoplasmáticos e nucleares sofrem proteólise, inclusive as proteínas dos próprios filamentos intermediários. Foi demonstrado que as procaspases -3 e -9 têm como alvo o filamento de queratina 8/18, através de um domínio de morte efetor, contendo proteína ligada ao DNA (DEDD – *DNA binding protein*). Uma característica ímpar é a atividade da cascata proteolítica de caspases, resultando na ativação de quinases e procaspases, inativação proteolítica de enzimas como PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*), ou degradação de proteínas estruturais como filamentos intermediários, sendo que muitas delas contêm um sítio para caspase na região “linker”L1-2 do domínio central α -hélice (OSHIMA, 2002). Outro sítio de clivagem da caspase é o domínio COOH terminal da K18, ou DALD/S (CAULIN; SALVESEN; OSHIMA, 1997). A clivagem neste sítio gera um neoepítopo que é especificamente reconhecido pelo anticorpo monoclonal *M30 CytoDeath* e isso ocorre no início da cascata apoptótica, antes da perda da assimetria da membrana, fragmentação do

DNA e clivagem da região L1-2 do domínio α -hélice. As queratinas são fosforiladas durante a apoptose, facilitando o rápido colapso do citoesqueleto e originando corpúsculos apoptóticos contendo grandes agregados de queratina (LEERS et al., 1999). Foi sugerido que estes agregados são expulsos das células e escapam dos fagócitos, posto que podem ser detectados no soro de pacientes com câncer (SUN et al., 2000). Concluiu-se que a clivagem C-terminal da K18 é um evento precoce na apoptose, pelo qual a caspase-9 é responsável direta e indiretamente, pela ativação das caspases-3 e -7. A clivagem da região L1-2 (*linker*) do domínio α -hélice é responsável pelo colapso final do esqueleto de queratina em grandes agregados; a fosforilação facilita sua formação (SCHUTTE et al., 2004). Na apoptose, K18 e K8 continuam associadas em agregados heteropoliméricos, mas nos estágios finais agregados de queratina foram liberados para o meio de cultura.

O neoepítipo de CK18 não é detectável em células epiteliais vivas; o anticorpo M30 é específico para este sítio no reconhecimento de células apoptóticas com filamentos citoplasmáticos e agregados de queratina. Células viáveis e necróticas são negativas. A imunorreatividade é independente do estado de fosforilação das citoqueratinas. A geração do neoepítipo é precoce na cascata apoptótica, antecedendo à reatividade da anexina V ou a positividade dos métodos de detecção da fragmentação do DNA (LEERS et al., 1999). A expressão precoce do M30 ocorre em todas as células de origem epitelial, inclusive as do trato genital feminino. A CK18 tem larga distribuição e pode ser co-expressada com CK8 em praticamente todos os epitélios (simples, não-estratificados, pseudo-estratificados, ductais). Ambas foram detectadas no embrião em desenvolvimento. A CK18 pode ser produzida em pequenas quantidades também em fibroblastos e outras células não-epiteliais (SCHAAFSMA; RAMAEKERS, 1994).

A rápida agregação dos filamentos de queratina (CAULIN; SALVESEN; OSHIMA, 1997) nas células apoptóticas faz com que a imunorreatividade para vários anticorpos para citoqueratina desapareça completamente (VAN ENGELAND et al., 1997); é mediada por sua hiperfosforilação (LIAO; KU; OMARY, 1997).

A CK18 é clivada por uma caspase, liberando um neoepítopo específico para M30, antes da fragmentação do DNA ocorrer, permitindo inclusive a quantificação de células epiteliais apoptóticas do citoesqueleto.

Logo após o disparo da cascata, um novo peptídeo C-terminal é proteoliticamente liberado da CK18 pela clivagem da ligação peptídica 396-397. O sítio DALD/S³⁹⁶, definido como o final do décimo resíduo do epítopo é compatível com o acesso e clivagem da caspase. Os produtos da clivagem da CK18 com características semelhantes àqueles encontrados neste estudo sugeriram que derivam da atividade da caspase-3 (ENGELAND et al., 1998).

Em células em apoptose avançada, a clivagem prosseguiu, resultando num fragmento menor de CK18 (20kD), onde o epítopo de M30 ainda era conservado; no início da apoptose a CK18 se mantém numa rede filamentosa, apesar da clivagem. Os agregados somente se formam com o progredir do processo apoptótico, provavelmente resultado da fosforilação da proteína. Na fase final, o epítopo é perdido (LEERS et al., 1999).

As citoqueratinas 8 e 18 (K8; K18) são os principais componentes dos filamentos intermediários das células de epitélio simples.

Durante a apoptose, filamentos intermediários de K18 se reorganizam em estruturas granulares enriquecidas por K18 fosforilada em serina 53. A K18, mas não a K8, gera um fragmento proteolítico durante o processo; as caspases -6, -3 e -7 podem clivá-la. A primeira cliva a K18 no terminal NH², em fragmentos de 26 kD, e

no terminal COOH em fragmentos de 22 kD; as outras duas clivam o fragmento de 22 kD num menor, de 19 kD. O sítio mais comum de clivagem para as caspases foi a sequência VEVD/A, localizada na região linker L1-2 da K18, que liga os dois domínios α -hélice principais, compartilhados por todas as proteínas dos filamentos intermediários. Um sítio adicional para as caspases -3 e -7 está localizado no final do domínio COOH terminal (*tail*).

A expressão de K18 com alanina ao invés de serina na posição 53 demonstrou que a clivagem na apoptose não requer a fosforilação da serina 53. Entretanto, K18 com glutamato ao invés de aspartato na posição 238 resistiu à proteólise (CAULIN; SALVESEN; OSHIMA, 1997)

As queratinas são heteropolímeros obrigatórios que constituem os filamentos intermediários das células epiteliais pela associação de ao menos um tipo de queratina I e um tipo de queratina II; as queratinas 8 e 18 são os principais componentes dos filamentos intermediários dos tecidos epiteliais simples, com uma só camada.

A K18 pode ser fosforilada *in vitro* em serinas por várias quinases; *in vivo* o principal sítio de fosforilação é na serina 53, implicada no aumento de solubilidade e alteração da polimerização (KU; OMARY, 1994), uma vez que os filamentos intermediários são altamente polimerizados e relativamente insolúveis em soluções aquosas normais. Neste estudo demonstrou-se que os filamentos K8/K18 são dramaticamente reorganizados na apoptose e esta reorganização é associada à fosforilação de K18 na serina 53.

3.4.3 APOPTOSE NA PLACENTA

A apoptose é irreversivelmente induzida através da ativação das caspases executoras, sendo considerado como um ponto de não-retorno. A caspase-3 é a proteína de mamíferos homóloga ao Ced-3 do *C. elegans*, sendo capaz de degradar várias proteínas citoplasmáticas e nucleares, além de ativar nucleases para a degradação do DNA (HUPPERTZ, 1999). Sua forma inativa (pró-caspase) foi localizada na mitocôndria e no citoplasma, enquanto que sua forma ativa está no citoplasma e no núcleo (MANCINI et al., 1998; SAMALI et al., 1998).

Nos vilos trofoblásticos da placenta humana a imunorreatividade para pró-caspase-3 predomina sobre a proliferação das células-tronco (mononucleares, no citotrofoblasto), enquanto que nos estágios altamente diferenciados do trofoblasto viloso, o sinciciotrofoblasto é preferencialmente marcado, com marcação em ambas as formas da caspase, inativa e ativa, o que sugere que a ativação da caspase 3 no trofoblasto ocorre no sinciciotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 1998).

A clivagem das proteínas tanto citoplasmáticas quanto de membrana leva à sua degradação; o filamento intermediário de citoqueratina 18 é clivado pelas caspases-3, -6 e -7 (CAULIN; SALVESEN; OSHIMA, 1997). Entretanto, os alvos principais destas caspases residem no núcleo, como as proteínas PARP (*Poli-(ADP-ribose) polimerase*), lamininas, entre outras.

A citoqueratina 18 é uma proteína dos filamentos intermediários que é clivada pelas caspase executoras. A conservação de um sítio específico de clivagem dentro da molécula de citoqueratina 18 e outras proteínas dos filamentos intermediários sugere que seu processamento seja um fenômeno comum fruto da clivagem da caspase na apoptose. Anticorpos capazes de reconhecer tal sítio, o qual não está presente em células saudáveis foi utilizado (LEERS et al., 1999). Sua localização citoplasmática aponta para a ativação das caspases executoras, indicando a irreversibilidade do processo.

A maquinaria requerida para a apoptose parece também ser utilizada em alguns passos da diferenciação celular (HUPPERTZ et al., 1998). Os vilos trofoblásticos humanos são um exemplo da interrelação entre os dois fenômenos (HUPPERTZ et al., 1999).

No coelho, como aparentemente em todas as demais espécies, a eficiência da circulação do sangue materno através da placenta diminui com o avanço da prenhez, quando o crescimento fetal é mais rápido e há um aumento da pressão intrauterina e tensão tecidual. Com isso temos o envelhecimento e a degeneração placentárias (EAGLE, 1941 ¹ *apud* REYNOLDS, 1949, p.539).

Em mulheres, ao oitavo mês gestacional, inicia-se a trombose de seios venosos da placenta (LEOPOLD, 1877 ² *apud* REYNOLDS, 1949, p.540) e o lúmen das veias é parcialmente obstruído por células gigantes. A partir do sétimo mês aumenta o peso seco da placenta desproporcionalmente ao seu volume, invertendo o que antes ocorria e isso foi considerado um sinal fisiológico do envelhecimento placentário (WEHEFRITZ ³ *apud* REYNOLDS, 1949, p.511).

¹ EAGLE, E. Blood choline variations in pregnancy in labor and in puerperium. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.42, p.262, 1941.

² LEOPOLD, G. Studien über die Uterusschleimhaut während Menstruation, Schwangerschaft und Wochenbett. **Archiv für Gynäkologie**, v.11, p.443, 1877.

³ WEHEFRITZ, E. Ueber chemische Altersveränderungen der menschlichen Plazenta und ihre Beziehung zum Problem des Geburtseintritts. **Archiv für Gynäkologie**, v.124, p.511, 1925.

Estes autores também observaram que há, concomitantemente, um aumento na porcentagem de aminoácidos como prolina, oxiprolina, triptofano e, principalmente, arginina, mantendo níveis altos em casos de gestações prolongadas.

Estudos para determinar se tecidos feto-placentários de gestações complicadas por hipertensão induzida (PIH) alteraram a expressão de proteínas associadas ao Fas nas membranas fetais, decídua e placenta. Em tecidos parafinizados foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para Fas, Fas ligante, caspase-3 e Bax. A caspase-3 pró-apoptótica teve forte marcação apenas no endotélio perivascular. Marcação generalizada foi observada nas células epiteliais amnióticas, citotrofoblasto coriônico e células da decídua do grupo controle e do PIH induzido. Entretanto, quase não se percebeu marcação no endotélio perivascular nos casos controle, enquanto que esta foi intensa em gestações afetadas por PIH. Há evidências de que Fas e Fas ligante são expressas nas membranas fetais na gestação normal e a apoptose por elas mediada ocorre em vários locais do tecido feto-placentário. A ocorrência de apoptose no trofoblasto e decídua, ao final da gestação, torna-se mais pronunciada (KOENIG; CHEGUINI, 2000).

No viló trofoblástico humano a cascata apoptótica inicia seus eventos mais precoces no citotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 1998) e nenhum efeito das caspases executoras pode ser encontrado em células normais dos vilos trofoblásticos; somente após fusão sincicial pode-se encontrar indicação da ativação da cascata apoptótica no sinciotrofoblasto, levando ao acúmulo de núcleos apoptóticos nos nós sinciciais (HUPPERTZ et al., 1998). Após extrusão, são encontrados na circulação materna e acredita-se que sejam engolfados por macrófagos provenientes dos pulmões maternos (HUPPERTZ; HUNT, 2000).

Foi testado o M30 como marcador específico de apoptose no trofoblasto; estudou-se vilos e zona juncional da placenta humana no 1^o e 3^o trimestres gestacionais, utilizando-se anticorpos para citoqueratinas 7 e 18 e também para a caspase-3 ativa (clivada) nas reações com M30 e TUNEL. Concluiu-se que o M30 é um marcador específico para células em fase tardia de apoptose no trofoblasto, o que se confirma pelo fato de que no trofoblasto as imunorreatividades do M30 coincidem parcialmente com aquelas para caspase-3 ativa. A clivagem da citoqueratina 18 inicia-se mais cedo que a do DNA, como podemos observar na figura 6, além do que a ativação da endonuclease pode ser evitada em algumas células trofoblásticas, por isso a superioridade do M30 em relação ao método TUNEL (KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001).

Figura 6 - Representação esquemática da cascata apoptótica
Mostrando o fluxo de eventos da iniciação à execução. Caspases executoras ativas degradam proteínas do citoesqueleto, como por exemplo, a CK18, e ativam endonucleases, as quais, por sua vez, degradam o DNA. O anticorpo M30 cora um maior número de células apoptóticas em relação ao TUNEL, pois a clivagem da CK18 é anterior a do DNA

Anticorpos anti-citoqueratina 18 marcaram o trofoblasto viloso, extraviloso e glândulas endometriais (FRANK; GENBACEV; BLASCHITZ, 2000). Anticorpos reconhecedores de outras citoqueratinas marcaram também células não-epiteliais, como as do mesênquima (HAIGH et al., 1999).

As células do trofoblasto extraviloso da cama placentária (*placental bed*) demonstraram marcação para anticorpo anti-citoqueratina 18. O M30 marcou apenas algumas destas células, enquanto que o TUNEL marcou células trofoblásticas em final de apoptose e outros tipos celulares no mesmo estágio. Havia células coradas com M30 e TUNEL (as células positivas para M30 foram imunorreativas para caspase-3 ativa e expressaram citoqueratina 7 e, mais fracamente, a 18; são células do trofoblasto extraviloso nos estágios finais de apoptose); houve marcação de células apenas com M30, as quais foram imunorreativas para ambas citoqueratinas e caspase-3. São células do trofoblasto extraviloso em apoptose avançada, antes da ativação das endonucleases e degradação do DNA; houve ainda marcação de células apenas pelo TUNEL, que foram imunonegativas para as citoqueratinas e interpretadas como células não-trofoblásticas em apoptose avançada (KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001).

Nos vilos os resultados foram semelhantes: o M30 corou áreas descontínuas do sinciotrofoblasto, algumas também com núcleos TUNEL-positivos, concordando com descrições anteriores de que a apoptose é uma característica típica do sinciotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 1998). As células TUNEL-positivas e M30-negativas apenas no estroma, devido à especificidade epitelial do M30. O número de células apoptóticas coradas com M30 é maior que com TUNEL devido ao maior período de clivagem da citoqueratina dentro da cascata apoptótica, em relação ao menor período de ativação da endonuclease (HUPPERTZ; FRANK; KAUFMANN,

1999). Os autores afirmam, como desvantagem e inverso do que ocorre com o M30, que o método TUNEL precisa ser adaptado para cada tipo de tecido, nem sempre conseguindo-se obter resultados reproduzíveis (HUPPERTZ et al., 1998).

A positividade do TUNEL não é necessariamente alcançada nos estágios finais em núcleos apoptóticos, uma vez que a atividade da endonuclease pode ser evitada (*bypassed*) (HUPPERTZ; HUNT, 2000), ou o núcleo pode ser expulso antes da marcação positiva (HUPPERTZ et al., 1998). Além disso, o TUNEL marcou células necróticas, sendo que todas as células marcadas pelo M30 demonstraram morfologia relativamente normal ou condensação (KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001).

Achados recentes relatam que em alguns tipos celulares a atividade enzimática da caspase pode ser evitada na apoptose (DOERFLER; FORBUSH; PERLMUTTER, 2000). O M30, que reconhece um fragmento de citoqueratina 18 caspase-mediado, é entretanto, caspase-dependente.

Verificou-se a utilidade do M30 na avaliação de apoptose no trofoblasto na placenta humana a termo, em tecidos parafinizados, comparando-se a positividade do M30 e de outro anticorpo monoclonal contra citoqueratina 18 (CK18), como também as taxas de apoptose entre M30 e o método TUNEL. Nos campos de tecido viloso a maioria das células M30-positivas foram CK 18-positivas no sinciotrofoblasto. Metade das células M30-positivas apresentaram marcação focal na camada sincicial e a outra metade ocorreu em abundância no sinciotrofoblasto em áreas com aumento de fibrinóide interviloso e periviloso. Houve pouca marcação de M30 no estroma dos vilos. Na decídua basal 2/3 das células positivas para M30 foram CK18 positivas no trofoblasto extraviloso, enquanto que 1/3 delas ocorreu no sinciotrofoblasto dos vilos de ancoragem (AUSTGULEN, 2002).

Uma vez que o método TUNEL detecta células epiteliais e não-epiteliais, temos uma maior marcação deste em relação ao M30; apesar disso o M30 foi considerado mais sensível quanto ao reconhecimento de apoptose no trofoblasto, posto que o neoepítipo de CK18 é exposto anteriormente à degradação do DNA na cascata apoptótica. Foi feita ainda a quantificação das células trofoblásticas apoptóticas marcadas com M30 e a taxa de apoptose foi menor àquela obtida com o TUNEL (0.03% versus 0.05%, respectivamente), talvez porque os critérios para um sejam mais críticos que para outro, e as células em início de apoptose devem ter sido eliminadas da contagem, diminuindo a estimativa; além disso, por ser menos específico, o TUNEL cora qualquer tipo de célula, enquanto que o M30, apenas aquelas que contêm CK18. Houve a ocorrência de células TUNEL-positivas e M30-negativas, portanto, principalmente nos vilos, sendo a minoria no estroma, sugerindo uma origem não-trofoblástica (AUSTGULEN, 2002).

As células híbridas trinucleadas resultantes da migração das células binucleadas até o epitélio uterino onde se fundem com estas últimas degeneram rapidamente, mostrando sinais de apoptose sob microscopia de luz. Células da membrana basal, da zona intermediária e coriônica de placentônios bovinos foram observados quanto à apoptose, através do ISEL (*in situ end labeling*), método semelhante ao TUNEL. Células apoptóticas estiveram presentes entre todas as populações celulares e durante toda a gestação, não havendo diferenças significativas entre as três áreas estudadas, mas sim entre os estágios gestacionais, sendo que um menor número foi encontrado no 150º dia, um maior no 220º dia, havendo uma queda daí para o 240º dia, além de um aumento lento até o 270º dia e o parto. Concluiu-se que no decorrer da gestação a apoptose pode estar envolvida no remodelamento do órgão e equilíbrio homeostático, enquanto que ao final, pode

ser um meio de eliminação de células produtoras de sinais progestagênicos (PFARRER et al., 1999).

Estudou-se apoptose no epitélio uterino e decídua de camundongos em até uma semana pós-coito, a fim de investigar as vias de apoptose e diferentes proteínas envolvidas no processo, como TNF α , TNFR-1, FasL, Fas receptor I, Bax, Bcl-2 e as caspases -9 e -3. Durante a implantação o epitélio uterino sofre apoptose devido à interação com o blastocisto, ocorrendo regressão das células deciduais e invasão das células trofoblásticas no compartimento materno. Na câmara de implantação e lúmen do epitélio adjacente foi observada imunorreatividade para TNF α e TNFR-1; na decídua em desenvolvimento houve expressão do Fas ligante. Bax e Bcl-2 revelaram padrão de expressão complementar com a primeira na zona decidual primária e Bcl-2 na adjacente (JOSWIG et al., 2003).

Houve forte marcação imunoistoquímica para a caspase-9 na decídua, enquanto que a caspase-3 foi expressa no epitélio uterino em apoptose. Apenas algumas células deciduais positivas para Caspase-3 foram encontradas ao redor do embrião, com padrão semelhante ao do método TUNEL.

A degeneração do epitélio uterino pela apoptose parece ser mediada pelo receptor TNF1, seguido da Caspase-3, enquanto que a leve regressão decidual não demonstra o receptor de morte, mas sim Bax, Bcl-2 e C9, indicando regulações diferentes para apoptose no epitélio e na decídua.

As caspases -9 e -3 (em sua forma ativa) não foram expressas no endométrio de fêmeas vazias até o terceiro dia pós-coito. A caspase iniciadora-9 foi expressa na decídua em desenvolvimento a partir do 4º dia pós-coito e a marcação aumentou paralelamente ao processo de decidualização. O epitélio uterino não revelou

imunorreatividade. No estroma houve marcação, de acordo com a evolução da decidualização (JOSWIG et al., 2003).

A forma ativa da caspase-3 foi claramente detectável no epitélio uterino apenas na fase de implantação e exclusivamente no epitélio ao redor da câmara de implantação e epitélio adjacente a partir do 4º dia pós-coito, com marcação intensa das células em degeneração no 5º dia. No 6º dia células deciduais nas proximidades da câmara exibiram grânulos fortemente marcados. A caspase-9 esteve fortemente expressada na decídua, mas não no epitélio, onde predominava caspase-3. A decídua revelou apenas algumas células caspase-positivas ao redor da câmara de implantação. Esta caspase executora poderia ter sido ativada pela caspase-9, mas parece sem explicação o fato da caspase-9 ser capaz de ativar a caspase-3 apenas em algumas células da zona decidual primária, levando a uma regressão bastante moderada das células deciduais.

Parece que a apoptose ao redor do epitélio uterino é primariamente induzida via TNF α e TNFR-1, seguida de ativação da caspase-3. A apoptose moderada na decídua parece requerer localização complementar e expressão de Bax e Bcl-2 na presença de C9. Ambos TNFR-1 e FasR estão em falta na decídua neste período, o que poderia apontar para uma via independente de receptores de morte (JOSWIG et al., 2003).

No 1º trimestre de gestação as células do trofoblasto extraviloso invadem a decídua materna. A invasão diminui a partir do 2º trimestre e pára no primeiro terço do miométrio. Na gestação tubária a invasão é maior, chegando às paredes das trompas, levando à ruptura. A apoptose nos 1º e 2º trimestres da gestação uterina e 1º trimestre da gestação tubária foi analisada pelos métodos TUNEL e M30 (VON RANGO et al., 2003). A apoptose esteve confinada à decídua basal. A maioria

destas células apoptóticas são epiteliais citoqueratina-positivas residindo no estroma. Conseqüentemente podem apenas ser trofoblasto extraviloso. O número de células apoptóticas no 2º trimestre é menor em relação ao 1º na gestação uterina. O número de células CD56⁺ NK cells, que são os leucócitos mais frequentemente observados no sítio de implantação, diminuiu do 1º para o 2º trimestre. A apoptose é menor em gestações ectópicas, em relação às eutópicas no 1º trimestre. Portanto, neste período da gestação uterina a indução de apoptose no trofoblasto extraviloso pelo sistema imune materno é um mecanismo usado para limitar a invasão deste. No 2º trimestre, paralelamente à diminuição do número de leucócitos, o mecanismo muda, havendo diminuição da apoptose. Na gestação tubária o microambiente é diferente e há falha no processo apoptótico. Macrófagos foram encontrados próximos às células apoptóticas (VON RANGO et al., 2003).

Em estudos com metaloproteinases 2 e 9, em relação à morte celular programada na placenta de ovelhas, da metade para o fim da gestação, observou-se que a apoptose ocorreu em regiões descontínuas da placenta, predominantemente no trofoblasto, próximo aos topos vilosos ou regiões basais das interdigitações feto-maternas. As metaloproteinases 2 e 9 parecem estar envolvidas na quebra das membranas basais, permitindo a migração celular; a digestão da matriz extracelular pode disparar a apoptose causando o aumento do padrão de ramificação viloso. Utilizou-se o método TUNEL para acessar células apoptóticas; um pequeno número de células em agrupamentos descontínuos foi identificado como TUNEL positivas; a maioria (mais de 80%) das células demonstraram características morfológicas características como condensação do DNA, brotamento (*shedding*) nuclear, encolhimento celular e presença de corpúsculos apoptóticos, principalmente localizados nas interdigitações fetais no placentônio em todos os estágios. As

metaloproteinases 2 e 9 estão nos locais de apoptose, sendo possível que a quebra da membrana basal de colágeno seja responsável pelo disparo do processo. São expressas tardiamente na gestação e em pequenas quantidades, atuando no remodelamento da placenta (RILEY et al., 2000).

A apoptose foi acessada pelo anticorpo M30 e as células foram quantificadas nos vilos e na decídua, sendo que houve um aumento da apoptose no sinciotrofoblasto na pré-eclâmpsia com fetos abaixo do peso, talvez por déficit circulatório. Na mesma camada, para o grupo com fetos com peso ao nascimento a apoptose foi menor, semelhante ao grupo controle. O aumento da apoptose no 1º grupo pode dever-se a mecanismos específicos associados à pré-eclâmpsia, como a baixa oxigenação da placenta, complicada por restrição do crescimento, ou seja reflexo da presença de injúria no sinciotrofoblasto. A maioria das células M30-positivas foram encontradas na camada sincicial, como pontos únicos na camada ou acumulados em áreas de fibrinóide peri- e interviloso. Nós sinciciais M30-positivos e fragmentos sinciciais foram observados. Poucas células apoptóticas foram encontradas no estroma dos vilos intermediários e terminais. Duas categorias de células positivas para M30 dominaram a decídua basal: trofoblasto extraviloso e pontos positivos na camada sincicial dos vilos de ancoragem. Não houve diferença significativa entre os grupos. O aumento da apoptose pode ser reflexo do dano à camada sincicial, diretamente relacionada à diminuição do aporte de nutrientes da mãe para o feto. Restrição no tamanho fetal e hipoxia placentária estão relacionados (AUSTGULEN et al., 2004). Tanto hipoxia quanto isquemia disparam a apoptose e aumentam o “turnover” no trofoblasto e brotamento do sinciotrofoblasto (HUPPERTZ; TEWS; KAUFMANN, 2001).

Estudou-se a inter-relação entre a cascata apoptótica e o turnover no trofoblasto viloso. Nos vilos do 1º trimestre gestacional a procaspase 3 foi quase que exclusivamente encontrada no citotrofoblasto e apenas focalmente no sinciciotrofoblasto. No 3º trimestre ambos os anticorpos demonstraram marcação descontínua nos vilos do citotrofoblasto e no sincício. Os dados sugerem que a apoptose se inicia nos vilos do citotrofoblasto, promovendo uma fusão entre eles e originando o sincício. A cascata se completa no sinciciotrofoblasto antes da expulsão dos núcleos apoptóticos por meio dos nós/brotos sinciciais, para a circulação materna. Quanto à relação entre apoptose e proliferação no trofoblasto, no 1º trimestre a taxa de proliferação do citotrofoblasto foi alta, principalmente devido ao rápido crescimento dos vilos mesenquimais. Metade dos núcleos incorporados pelo sincício são expulsos por apoptose. No 3º trimestre a redução é de 1/10, consistente com a redução do crescimento dos vilos. Grande proporção de núcleos sinciciais (80%) incluídos por fusão são expulsos por apoptose; no 1º trimestre estes são usados para a expansão do sinciciotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 1998).

Algumas evidências estruturais de apoptose estão presentes nos estágios iniciais, antecedendo a ativação irreversível das caspases executoras, como: perda dos microvilos de superfície, formação de bolhas na superfície celular (“blebs”) e, em alguns tecidos, como no trofoblasto viloso humano, o processo de fusão sincicial. Com a progressão da cascata apoptótica e atuação das caspases executoras, há condensação da cromatina e alterações no formato do núcleo, juntamente com perda de volume nuclear. No trofoblasto humano estes eventos são seguidos de fragmentação da célula e do núcleo, resultando em corpúsculos apoptóticos, os quais são eliminados por macrófagos, evitando a resposta inflamatória (HUPPERTZ, 1999).

3.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

O desenvolvimento de uma única célula-ovo fertilizada para formar um organismo multicelular complexo envolve replicação celular, crescimento e especialização progressiva para várias funções (diferenciação). Exceto nos gametas, a replicação celular é conhecida como mitose. O intervalo entre as divisões mitóticas, as quais originam duas células-filhas idênticas é denominado ciclo celular. A divisão e a diferenciação celulares são proporcionais à morte celular ou apoptose, tanto durante o desenvolvimento e crescimento do organismo imaturo quanto no adulto. O ciclo celular divide-se basicamente numa fase mitótica relativamente curta (fase M) e uma de não-divisão (interfase), a qual ocupa maior parte do ciclo. Há ainda um período discreto durante a interfase, quando há replicação do DNA (fase S, ou de síntese), que ocorre antes do início da mitose. A interfase apresenta três fases distintas, a saber, a fase G1, mais longa, entre o final da fase M e o início da fase S, onde as células diferenciam-se; a fase G2, entre o final da fase S e o início da fase M, mais curta, onde as células se preparam para a mitose; e a fase G0, para algumas células que deixam o ciclo após a fase M, entrando num estado de função diferenciada contínua. Cada uma das fases do ciclo leva várias horas para ser concluída, mas apresenta duração relativamente constante (S, G, M); a fase G1 é variável, e a G0 pode durar pela vida toda (YOUNG; HEATH, 2001).

Historicamente, o PCNA foi descrito como um auto-anticorpo presente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico capaz de identificar um antígeno presente em células em proliferação. Este antígeno (PCNA) é uma proteína nuclear não histônica de 36 KD, envolvida na síntese de DNA, sendo responsável pela sua

replicação. Por ser um marcador de antígeno nuclear, considerar apenas como positivas as células com núcleos marcados (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999).

O PCNA é uma proteína nuclear associada com o ciclo celular, que atua como co-fator para a DNA polimerase delta. Originalmente detectado por Miyachi; Fritzler; Tan (1978), sua distribuição no ciclo aumenta a partir de G1, atingindo um pico máximo em S, diminuindo a partir de G2 e exibindo baixíssimos níveis em M e em células quiescentes (G0), não podendo, nestes casos, ser identificada pela imunohistoquímica.

Representa uma proteína nuclear não histônica, que atua como um co-fator da DNA polimerase delta, sendo observada sua presença no ciclo celular na fase G1 tardia, com um pico na fase S e declínio nas fases G2 e M. A demonstração da imunoexpressão do PCNA permite verificar sua verdadeira fração proliferativa (MIGHELL, 1995).

Maruo et al.(2000) estudaram a regulação da proliferação e da apoptose em placentas humanas, através da expressão de PCNA e ISEL, para detecção da fragmentação de DNA, respectivamente. Ambos foram expressos nos citotrofoblastos, sendo mais abundantes no início da placentação, menos abundantes no segundo terço gestacional e menos ainda na placenta a termo. Estes resultados indicam que a placenta jovem caracteriza-se pela alta atividade proliferativa das células do citotrofoblasto, associada à alta ocorrência de apoptose.

Novellino et al.(2003), estudando a correlação entre a imunoexpressão de PCNA e escores de malignidade em tumores humanos, consideraram como positivas as células que apresentaram reação restrita ao núcleo, representada por coloração acastanhada e ou amarelada, independente da intensidade da coloração.

Boos, Janssen, Mülling (2003) estudaram os fenômenos de proliferação e apoptose em placentas bovinas, utilizando-se da proteína Ki-67 e do método TUNEL, respectivamente, em placentas vindas de abatedouros, provenientes de cesareanas, coletadas logo após expulsão fetal e também alguns casos de retenção placentária. Tanto o epitélio fetal quanto o materno apresentaram um maior índice de proliferação celular se comparado ao estroma; durante a gestação a maior porcentagem de proliferação foi para o epitélio coriônico fetal, e houve uma diminuição em ambas as faces epiteliais após a expulsão fetal, em relação ao último mês de gestação. A apoptose aumentou durante a prenhez nas criptas do epitélio materno, estroma materno e epitélio coriônico, sendo maior no epitélio coriônico quando da retenção placentária.

A retenção das membranas fetais é caracterizada pelo alto número de células epiteliais coriônicas em apoptose imediatamente após a expulsão do feto. A maturação incompleta dos placentônios influencia na retenção placentária e a apoptose maciça neste período pode dever-se à diminuição do suprimento sangüíneo no útero. Morfologicamente, a retenção placentária bovina caracteriza-se pela maturação incompleta ou a redução insuficiente no número de células das criptas epiteliais maternas no período que antecede o parto.

A homeostase placentária é fundamental no crescimento, maturação e liberação ou retenção das membranas fetais.

Apesar das carúnculas maternas crescerem durante toda a gestação, o crescimento dos cotilédones cessa, e seu tamanho diminui ao redor do sétimo mês nas vacas (FERRELL, 1991), sendo que a proporção entre os tecidos materno e fetal também se modifica, sendo 1:1 no primeiro terço, aproximadamente 1.5:1 no segundo terço e quase 2:1 nos dois últimos meses gestacionais (LAVEN; PETERS,

2001). O aumento da massa uterina pode estar relacionada à proliferação ou à hipertrofia celular, mas a primeira, segundo Björkman (1969) é que facilita o aumento no tecido placentário, diferentemente da região interplacentomal, onde predomina a segunda (REYNOLDS et al., 1990).

A degeneração das células epiteliais das criptas maternas e, em menor extensão, do epitélio trofoblástico, é detectável por toda a gestação, refletindo o “turnover” tecidual e a contribuição do epitélio materno ao embriotrofo (BJÖRKMAN, 1969).

Ao término da prenhez, inicia-se a maturação placentária, caracterizada por mudanças histológicas concentradas no epitélio das criptas maternas, sendo que o número e peso destas células diminui, as células tornam-se achatadas e largas e estabelecendo contato com maior número de células trofoblásticas e células de revestimento do tecido conjuntivo materno. Em algumas áreas pode mesmo faltar o epitélio materno. A maturação do órgão promove maior contato entre as circulações sangüíneas materna e fetal e é um pré-requisito para haver o desprendimento e a liberação das membranas fetais (STALLMACH et al., 2001). As células gigantes também diminuem em número próximo ao parto (GROSS; WILLIAMS; RUSSEK-COHEN, 1991)

As células imunopositivas foram identificadas pela coloração marrom de seu núcleo. Mais de 40% das células epiteliais das criptas maternas, incluindo as gigantes, apresentaram positividade nos primeiros 2 terços gestacionais, apresentando um padrão de marcação como uma corrente, com alguns poucos elos negativos (azuis). A extensão da corrente diminui com o decorrer da gestação. No terço final eram comuns células achatadas e marcadas. O número de células positivas diminuiu entre o primeiro e terceiro trimestre. No segundo e terceiro

trimestres as células trofoblásticas marcadas eram em menor número em relação ao epitélio materno, mas eram em maior quantidade no primeiro terço. Também havia marcação de células gigantes e em menor número no tecido conjuntivo materno e fetal e detectável em algumas células endoteliais.

Durante a gestação o número de células em apoptose e corpúsculos apoptóticos acessadas pelo TUNEL foi baixa. Sua localização era mais freqüentemente os epitélios materno e fetal e a interface entre ambos. Tais células eram menores; os fragmentos eram corados em marrom; o azul da contracoloração da cromatina condensada era bastante evidente no interior das células e nos corpúsculos apoptóticos. Estes últimos podiam ser visualizados no interior de células epiteliais adjacentes maternas ou fetais. As células gigantes em apoptose apresentavam dois núcleos picnóticos próximos um do outro, numa célula de tamanho reduzido. Foram raras as células apoptóticas no tecido conjuntivo. Células e corpúsculos apoptóticos foram encontrados com freqüência no epitélio trofoblástico assim como entre as células gigantes; houve um aumento destes elementos entre os dois primeiros trimestres e o terceiro, assim como entre os demais grupos de animais e aquele que apresentou retenção de placenta. Houve predominância no epitélio trofoblástico.

As células apoptóticas aumentaram do primeiro para o terceiro trimestre. A média de células e corpúsculos apoptóticos no epitélio materno foi significativamente menor em todos os estágios gestacionais, exceto no nono mês. No estroma materno apenas algumas poucas células foram detectadas, sendo que a maioria dos placentônios coletados de abatedouros não apresentaram apoptose no estroma. Nestes, a apoptose foi crescente com o decorrer da gestação, principalmente nos

dois terços finais. Nos demais grupos houve diferenças entre o primeiro e último terço. Havia pouca apoptose no tecido conjuntivo fetal.

Ambos os processos foram inversamente proporcionais durante a prenhez e próximo ao parto. A proliferação diminui à medida que a apoptose aumenta, sendo mais evidente no epitélio materno. O compartimento materno tem maior capacidade de crescimento (BJÖRKMAN, 1969). A capacidade de proliferação das células do estroma, entretanto, é relativamente baixa, sendo que o aumento do tecido conjuntivo provavelmente se deva à produção de fibras conjuntivas (BOOS; STELLJES, 2000). Há estudos sugestivos do envolvimento deste tecido na separação no momento pré-parto (SOBIRAJ, 1992).

A alta porcentagem de células em proliferação indicam sua contribuição à nutrição histotrófica fetal (BJÖRKMAN, 1969). Estes autores baseiam-se na observação de que corpúsculos apoptóticos podem ser freqüentemente encontrados entre os epitélios materno e fetal e em maiores taxas no epitélio fetal, relacionados à fagocitose no lado fetal. As células achatadas do epitélio materno, presentes ao final da gestação e positivas quanto à proliferação sugerem que a mudança no peso celular pode ser consequência de uma alteração nas necessidades metabólicas (STALLMACH et al., 2001)

O número de células em apoptose em ambos os compartimentos aumentou durante a gestação e também após o parto, refletindo o início da regeneração tecidual e a contínua nutrição histotrófica fetal, com fagocitose das células epiteliais maternas, após um período inicial de rápido crescimento placentário.

A não visualização de corpúsculos apoptóticos em relação à alta porcentagem de células em proliferação detectáveis pelo Ki-67 pode ser decorrente do fato da

fagocitose pelas células adjacentes dos primeiros ser muito rápida (VERHAEGEN, 1998).

Estudos referem como causa de retenção placentária a sua incompleta maturação morfológica (SCHOON, 1989 *apud* BOOS, 2003). O número de corpúsculos e células apoptóticas aumentado em ambos os epitélios após expulsão fetal, em relação aos encontrados no último mês gestacional o quando de retenção refletem a maturação da placenta (SCHOON, 1989 *apud* BOOS, 2003).

Mais corpúsculos apoptóticos são detectáveis no epitélio trofoblástico e epitélio das criptas uterinas em animais com retenção, talvez porque o processo de redução das células epiteliais ainda está ocorrendo imediatamente após a expulsão fetal neste caso (BJÖRKMAN; SOLLEN, 1961). A ausência de uma maciça apoptose no período pré-parto não seria a causa mas sim a consequência de uma mudança nos padrões endocrinológicos próximo ao parto levando à retenção.

Concluiu-se que a proliferação e apoptose exibem padrões específicos para cada estágio gestacional assim como para os diversos tipos celulares neste período. A proliferação desempenha importante papel no crescimento placentário e, juntamente com a apoptose, atuam na regeneração e nutrição histotrófica fetal. A apoptose é essencial para a maturação placentária e liberação das membranas fetais.

3.6 EOSINOFLUORESCÊNCIA

3.6.1 Microscopia de fluorescência e apoptose

Quando uma célula normal recebe um sinal para iniciar a apoptose, a modificação característica vista ao microscópio óptico é a condensação da cromatina nuclear ou picnose, formando uma ou mais massas escuras, justapostas à membrana nuclear. Simultaneamente, a célula afasta-se de suas vizinhas devido à perda dos dispositivos de aderência, e a eosinofilia do citoplasma aumenta. Nos cortes histológicos corados com ematoxilina e eosina (HE), nos estágios iniciais da apoptose, o citoplasma é eosinófilo e os núcleos estão condensados e fortemente corados em azul; mais tardiamente, temos corpúsculos apoptóticos, pequenos núcleos condensados e citoplasma pouco visível (YOUNG; HEATH, 2001). Geralmente o grau de atividade de qualquer célula pode ser avaliado pela aparência de seu núcleo. Células inativas possuem núcleos pequenos, com cromatina condensada e nucléolo pequeno ou ausente. Naquelas mais ativas, o material nuclear está disperso (eucromatina), com um nucléolo proeminente.

A técnica de coloração HE é a mais comumente usada em histologia animal e na rotina da patologia. A hematoxilina é um corante básico, que cora estruturas ácidas e carregadas negativamente em azul; os núcleos, os ribossomos e o retículo endoplasmático rugoso têm forte afinidade por ele, devido ao seu alto conteúdo de DNA e RNA, respectivamente, sendo utilizado para a demonstrar a forma do núcleo. Em contraste, a eosina, um corante ácido, possui afinidade à estruturas de carga positiva, tais como mitocôndrias e outros componentes citoplasmáticos, corando-os em rosa ou vermelho. A maioria das proteínas citoplasmáticas é básica, sendo o

citoplasma corado em rosa ou rosa-avermelhado. Portanto, quando o corte corado em HE é visto ao microscópio de fluorescência, o DNA aparece em amarelo-esverdeado fluorescente, e o RNA, em laranja-avermelhado fluorescente, evidenciando o núcleo e o citoplasma, respectivamente (YOUNG; HEATH, 2001).

Stinchcombe et al. (1995) foram os idealizadores do emprego da eosinofluorescência na detecção e quantificação de apoptose em hepatocarcinomas, baseando-se na forte propriedade eosinofluorescente dos corpúsculos apoptóticos em cortes teciduais corados com HE. Foi utilizada microscopia de fluorescência para a quantificação, confirmando-se os achados com microscopia de luz transmitida, pela simples mudança de uma para a outra, sequencialmente. Corpúsculos apoptóticos sem cromatina mostraram mais altos índices de fluorescência, enquanto que nos demais contendo cromatina foi geralmente baixa, provavelmente pelo baixo grau de condensação de seus componentes eosinofílicos; além daqueles com morfologia característica, encontrou-se pequenos corpos fluorescentes de formas heterogêneas, alguns dos quais não puderam ser detectados pela microscopia de luz transmitida convencional. Acredita-se que sejam resquícios de células apoptóticas por estarem localizados no interior de hepatócitos intactos e demonstrarem intensidades de fluorescência próximas às dos corpúsculos apoptóticos característicos, e também por alguns deles estarem adjacentes à corpúsculos apoptóticos maiores, como que resultando de sua fragmentação ou degradação. Uma observação importante é que apenas estágios avançados de apoptose são detectáveis, negligenciando-se estágios iniciais, nos quais pode-se observar a condensação da cromatina. A menor intensidade de fluorescência que exibem os corpúsculos apoptóticos contendo cromatina pode ainda acabar

causando uma estimativa incorreta de sua incidência, limitando a utilização desta metodologia em estudos analíticos dos diferentes estágios apoptóticos.

Wood, Sarma, Archer (1999) utilizaram-se da eosinofluorescência dos corpúsculos apoptóticos para quantificar lesões hepáticas em ratos mais ou menos resistentes à carcinogênese. Após imunoistoquímica, os cortes foram contra corados com HE, de acordo com a metodologia descrita por Stinchcombe et al. (1995). Células apoptóticas foram identificadas através da eosinofluorescência, e confirmação por microscopia de luz transmitida. Os autores referem a superioridade deste método em relação ao método TUNEL, o qual marca igualmente células em necrose, apoptose e é incapaz de detectar corpúsculos apoptóticos sem cromatina (GRASL-KRAUPP et al., 1995). A detecção de corpúsculos apoptóticos eosinofílicos apresenta maior sensibilidade e rapidez, além da facilidade na confirmação de que uma estrutura fluorescente representa um corpo apoptótico pela simples mudança para a luz transmitida normal ao microscópio.

Smith, Baker e Symonds (1997), observando a ocorrência de apoptose na placenta normal humana em cortes teciduais corados com HE, compararam-na com o método TUNEL e concluíram que as taxas médias de ocorrência de corpúsculos apoptóticos na placenta humana no primeiro terço gestacional foi menor (0.07%) do que no terceiro terço (0.14%); em contrapartida, Chan et al. (1998), ao repetirem o experimento, obtiveram valores inversos (1.22% contra 0.53%, para o primeiro e terceiro terços gestacionais, respectivamente. Apesar das disparidades numéricas entre os autores, houve um consenso entre os achados obtidos por ambas as técnicas de coloração, TUNEL e HE.

4. MATERIAL E MÉTODO

Segue abaixo o material utilizado e a metodologia empregada para a realização deste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas placentas de 42 animais em diferentes fases gestacionais, provenientes do *campus* de Ilha Solteira (SP), UNESP, do *campus* de Pirassununga, USP, e de abatedouros-frigoríficos situados em São João da Boa Vista (SP), Feira de Santana (BA), Belém (PA), São José dos Campos (SP), Aguaí (SP), e Curitiba (SC).

De acordo com a duração da gestação na búfala, que é em média de 305-320 dias ou de, aproximadamente, 10 meses (HAFEZ, E.S.E., 2004), o material foi separado em 4 grupos:

Grupo 1 – 2 a 4.5 meses: 15 fêmeas

Grupo 2 – 5 a 6.5 meses: 13 fêmeas

Grupo 3 – 7 a 8.5 meses: 7 fêmeas

Grupo 4 – 9 a 10 meses: 7 fêmeas

4.2 DETERMINAÇÃO DAS IDADES FETAIS

Após a abertura da cavidade abdominal para a retirada do útero e seu conteúdo, realizou-se uma incisão no sentido craniocaudal do cérvix uterino em direção ao corno gestante, removendo-se o feto para a tomada das medidas cefalococcígeas (*crown-rump*), a fim de se determinar a idade de prenhez, de acordo com fórmulas estabelecidas por Abdel-Raoulf e El-Naggar (1968) *apud* Ribeiro (1998).

Determinou-se que $Y=74+(9/2)X$ (para fetos com menos de 20 cm) e $Y=74+(9/4)X$ (para fetos com mais de 20 cm), sendo X o comprimento do ápice ao sacro(A-S), equivalente à distância do ponto mais alto da cabeça (frente) até a base da cauda, acompanhando a curvatura do corpo, e Y é a idade da prenhez a ser calculada, em dias.

4.3 REMOÇÃO DOS PLACENTÔNIOS

Após a inversão do útero, os placentônios foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% (Paraformaldehyde, Sigma chemical Co., USA) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 ou em formol 10% tamponado, sendo o volume do tampão 10 vezes superior ao tamanho dos tecidos removidos. Fragmentos menores foram recortados e novamente imersos nos fixadores, mantendo-se a proporção 10:1. As amostras foram então transferidas para o laboratório para o processamento em paraplast.

4.4 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

4.4.1 Processamento em paraplast (Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus, Oxford Lab., USA) e obtenção dos cortes de tecido

Os placentônios foram recortados em cubos menores com lados medindo aproximadamente 0,5 cm e colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% ou formol 10% em PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline – DPBS, Gibco Co., USA), permanecendo por 24 – 48 horas. Em seguida o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast.

Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo (Leika, German) corados com hematoxilina de Harris e eosina para análise histopatológica e microscopia de fluorescência (Microscópio Nikon Eclipse E800); cortes de 4 μ m foram colocados em lâminas silanizadas a 4% em acetona (organosilano, 3-Triethoxysilylpropylamine, A3648, Sigma) e submetidos às diferentes reações imunoistoquímicas para acessar células em apoptose e em proliferação celular.

4.5 DETECÇÃO DE APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.5.1 Anticorpos e reagentes

Anticorpos monoclonais de camundongo M30 CytoDeath (Boehringer Mannheim, Germany) e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, DAKO – PC-10, DAKO A/S, Denmark). Anticorpo policlonal de coelho Cleaved Caspase-3 (Asp 175 – Cell Signaling Tech., USA). Anticorpos policlonais de coelho anti-IgG de camundongo e cabra anti-coelho (Dako Corporation, Carpinteria, USA). “Blocking Kit” (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA). Reagente Estreptavidina/Peroxidase (Dako Corporation, código K 1500, Carpinteria, USA). Reagente Estreptavidina/FITC (Dako Corporation, código F 0422, Carpinteria, USA). 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, EUA). Peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical, EUA). Hematoxilina de Harrys (Sigma Chemical, EUA). Kit LSAB(Dako S/A, Denmark). Kit DAB (Liquid DAB + Substrate chromogen system, Dako Cytomation, CA 9303, USA).

4.5.1 Detecção de apoptose

4.5.1.1 Reação imunoistoquímica com anticorpos monoclonais de camundongo M30, e de coelho Caspase 3 Clivada

Cortes de tecidos incluídos em parafina foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico. A recuperação de antígeno foi feita usando panela de pressão, em tampão ácido cítrico 0,1 M para M30 e citrato de sódio 0,1 M para Caspase 3 clivada, por 5 minutos, foram submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%

em metanol por 30 minutos no escuro. Os cortes foram então lavados com PBS e permeabilizados com Triton X-100, Após lavagem com solução de PBS. Tratado a seguir com reagentes do “Blocking Kit” segundo o protocolo do fabricante, seguido de lavagem em PBS. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com soroalbumina bovina 1,5% em PBS). Em seguida os tecidos foram incubados em atmosfera úmida “overnight” a 4°C com os diferentes anticorpos primários. As amostras foram incubadas com anticorpos secundários biotinilados por 30 minutos em atmosfera úmida a 37°C, seguida por incubação de 45 minutos com estreptavidina/peroxidase, intercaladas por lavagens em PBS e a revelação feita 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical, USA) em PBS com peróxido de hidrogênio, e contracoloração com hematoxilina de Harrys.

4.5.2 Detecção de proliferação celular

4.5.2.1 Reação imunoistoquímica com anticorpo monoclonal PCNA

(Proliferating Cell Nuclear Antigen, DAKO – PC-10, DAKO A/S, Denmark).

Seguiu-se o mesmo protocolo para detecção de M30 e Caspase-3, até bloqueio de peroxidase endógena. Após lavagem com PBS, a recuperação de antígeno foi feita usando forno de microondas (Sanyo, Brasil), potência máxima, em tampão citrato de sódio 0,1 M e ácido cítrico 0,1 M, na proporção 4:1, em água destilada, por aproximadamente 7-8 minutos. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5% (Skim Milk) em água destilada, em atmosfera úmida a 37⁰ C, por 10 a 15 minutos, seguido de lavagem com PBS. As amostras foram, então, incubadas com o anticorpo primário (PCNA- monoclonal mouse

antibody to human), em atmosfera úmida, *overnight*, a 4°C. As lâminas foram lavadas em PBS. As amostras foram incubadas com anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulinas de camundongos por 30 minutos em atmosfera úmida a 37°C, posteriormente, foi incubada com o complexo estreptavidina por mais 30 minutos, nas mesmas condições laboratoriais. intercaladas por lavagens em PBS. A revelação foi feita com o kit DAB (diaminobenzidina), DAKO, contra corada com hematoxilina de Harrys.

A leitura das lâminas de imunoistoquímica foi feita utilizando-se microscópio de luz Nikon Eclipse E-800 e igualmente analisadas semi-quantitativamente, evidenciando-se, assim, a positividade da reação e o padrão de distribuição.

Foi considerado positivo quando as células apresentavam intensidade avaliada na escala de zero a três cruces, sendo (-) = ausente, (+) = presença de marcação/marcação fraca; (++) = marcação moderada, e (+++) = marcação forte/severa (SHAH et al., 1998; XUE et al., 2005). Para efeito da análise, convencionou-se definir para cada valor da escala de 0 a 3⁺ os seguintes escores: 0 para 0; 1,0 para 1⁺; 2,0 para 2⁺; e 3,0 para 3⁺.

4.6 UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Cortes de tecido de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina de Harris e eosina para pesquisa de células em apoptose e corpúsculos apoptóticos sob microscopia de fluorescência. Foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E-800, com filtro para fluorescência verde (465-495 nm) para a identificação de corpúsculos apoptóticos que apresentavam fluorescência verde citoplasmática.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados semi-quantitativos foram analisados por testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a natureza dos dados, utilizando programas estatísticos do GraphPad Prism V.3 statistical software (California, EUA). Foram consideradas diferenças significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DE APOPTOSE

Quarenta e dois animais foram analisados, sendo divididos em diferentes períodos de gestação: 1º grupo, de 2 a 4 meses e meio de gestação (N=15), 2º grupo, de 5 a 6 meses e meio de gestação (N=13), 3º grupo, de 7 a 8 meses e meio de gestação (N=07), e 4º grupo, de 9 a 10 meses de gestação (N=07) (Anexo 1). Foi utilizado método de imunoistoquímica para detecção de apoptose e proliferação celular. Em todos os casos houve marcação de intensidade variada para todos os anticorpos empregados no experimento, de forte, moderada a fraca, de acordo com o período gestacional estudado.

As estruturas placentárias observadas quanto à ocorrência de marcação foram o epitélio uterino, o estroma endometrial, o epitélio trofoblástico, o mesênquima, e células gigantes placentárias.

5.1.1 Imunoistoquímica

5.1.1.1 Detecção de Caspase- 3 Clivada na placenta de búfala

Foi detectada a presença de caspase-3 clivada nas células placentárias ao longo de toda a gestação, conforme a tabela 2. Foi observada a ocorrência de marcação nuclear em alguns casos (Figura 7A).

Houve marcação de intensidade variável em todos os grupos de animais estudados (Anexo 2).

No primeiro grupo de animais , observou-se predominância de marcação no epitélio uterino (Figura 7B), havendo também marcação trofoblástica. Fileiras de células marcadas de ambos os lados epiteliais, materno e fetal (Figuras 7C e 7D), foram observadas. Notou-se a ocorrência de células gigantes marcadas em ambos os epitélios, apesar de haver predominância no epitélio uterino (Figuras 7E e 7F). Corpúsculos apoptóticos foram observados, principalmente no epitélio uterino, mas também na zona de contato entre este e o trofoblasto, e no epitélio trofoblástico. A marcação das células do tecido conjuntivo, tanto estromal quanto mesenquimal foi apenas ocasional.

O padrão morfológico das células em apoptose foi basicamente condensação da cromatina nuclear, além da presença dos corpúsculos apoptóticos.

Os controles negativos dos diversos grupos estão expressos nas 11 A, 11 B, 11C e 11 D.

Figura 7 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 1º grupo de animais. ES = estroma endometrial M = mesênquima fetal

Observar os seguintes detalhes

- A = Presença de célula gigante (CG) mononucleada com marcação citoplasmática e nuclear (seta) no epitélio trofoblástico (Tr)
- B = Marcação de células epiteliais em ambos os compartimentos placentários (setas) , fetal (Tr) e materno, sendo mais evidente no epitélio uterino (Eu)
- C = Presença de fileiras de células epiteliais marcadas (setas), principalmente no lado materno (Eu)
- D = Grupos de células marcadas no epitélio uterino (Eu) Destaque para célula gigante binucleada (Bi)
- E, F = Presença de células gigantes multinucleadas (*) no epitélio trofoblástico (Tr)

No segundo grupo de animais, predominou a marcação epitelial uterina (Figura 8A), sendo que em quase a metade dos animais houve também marcação trofoblástica. O padrão de marcação foi, muitas vezes, o de células enfileiradas (Figura 8B). As células gigantes binucleadas aparecem em ambos os epitélios (Figura 8C). Corpúsculos apoptóticos foram encontrados tanto no epitélio uterino quanto no trofoblástico, predominando, entretanto, no segundo, além de episódios de marcação no estroma endometrial. As células apoptóticas apresentaram cromatina condensada e núcleos picnóticos.

Figura 8 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 2º grupo de animais

A = Presença de células uterinas marcadas (Eu). Detalhe para célula epitelial fortemente marcada (*)

B = Presença de fileiras de células epiteliais marcadas, principalmente no lado materno (Eu)

C = Marcação de células gigantes (*) em ambos os epitélios, trofoblástico (Tr) e uterino (Eu)

No terceiro grupo, houve predominância de marcação no epitélio uterino, também ocorrendo marcação no trofoblasto. Foram também observadas fileiras de células marcadas. As células gigantes marcadas foram encontradas em ambos os compartimentos, materno e fetal. Houve marcação no estroma endometrial (Figuras 9A, 9B e 9C).

A presença de corpúsculos apoptóticos foi predominante no trofoblasto. A apoptose foi evidenciada morfológicamente pela condensação da cromatina e picnose nuclear (Fig. 9D).

Figura 9 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 3º grupo de animais

A = Presença marcação predominante de células epiteliais uterinas (Eu) e estroma endometrial (ES)

B = Destaque para vilo materno (VM) com célula gigante (CG) marcada no topo

C, D = Células epiteliais marcadas apresentando cromatina condensada e núcleos picnóticos (setas)

No quarto grupo a maioria das células marcadas pertence ao epitélio materno, havendo ainda animais apresentando marcação trofoblástica conjunta. As fileiras de células com marcação foram observadas. Marcação de células gigantes foi observada no epitélio trofoblástico e uterino. Os corpúsculos apoptóticos (Figura 10E) estiveram presentes de maneira equalitária em ambos os lados, e houve ocorrência de marcação estromal. Observou-se cromatina condensada como sinal morfológico de apoptose (Figuras 10A, 10B, 10C, 10D).

Houve um aumento estatisticamente significativo entre os três primeiros grupos de animais em relação ao 4º grupo ($p < 0.05$, testes de ANOVA e de Newman-Keuls) (Gráfico 1).

Figura 10 - Fotomicrografias mostrando a expressão de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala no 4º grupo de animais

- A = Célula em apoptose com agregados de cromatina condensada (Cc) no trofoblasto (Tr)
 B = Presença de fileiras de células epiteliais marcadas (setas), principalmente no lado materno (Eu)
 C, D = Presença de células gigantes marcadas (*) no epitélio uterino (Eu) e trofoblástico (Tr)
 E = Destaque para a presença de corpúsculos apoptóticos (CA) no epitélio trofoblástico (Tr)

Figura 11 - Fotomicrografia mostrando os controles negativos de Caspase-3 Clivada em placenta de búfala nos diversos grupos estudados., sendo

A ,Representante do 1º grupo; **B** , 2º grupo ; **C**, 3º grupo; **D**, 4º grupo, respectivamente

Gráfico 1 - Análise semi-quantitativa da expressão de Caspase 3 clivada

(mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) em células de placenta de búfala em diferentes períodos gestacionais

N = N° de animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao 1º, 2º e 3º terço gestacional (testes de ANOVA e Newman-Keuls)

5.1.1.2 Detecção de M30 na placenta de búfala

Foi detectada a presença de neoepítomos de citoqueratina 18 utilizando-se o anticorpo monoclonal M30 CytoDeath na placenta ao longo de todo o período gestacional (Anexo 3); observou-se ocasionalmente marcação nuclear. Houve variação na intensidade de marcação entre os grupos (Anexo 3).

O primeiro grupo de animais estudados apresentou uma predominância de marcação no lado materno (Figura 12B), havendo menor marcação no trofoblasto, embora alguns casos exibissem igualdade de células marcadas entre mãe e feto. Notou-se a ocorrência de células gigantes marcadas no epitélio uterino e na área de contato entre mãe e feto (Figura 12A), e marcação de células binucleadas trofoblásticas (Figura 12C), algumas vezes também com marcação nuclear. Corpúsculos apoptóticos foram observados em ambos os epitélios, mas principalmente no epitélio uterino (Figura 12D). A marcação das células do tecido conjuntivo, tanto estromal quanto mesenquimal (Figura 12A) foi freqüentemente observada.

A morfologia observada nas células em apoptose foi a condensação da cromatina nuclear.

Figura 12 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 1º grupo de animais

- A = Presença de células gigantes (CG) marcadas no epitélio uterino (Eu) e na interface materno-fetal
- B = Predominante marcação no epitélio uterino (Eu)
- C = Célula gigante multinucleada (*) com marcação no trofoblasto (Tr)
- D = Corpúsculos apoptóticos (setas) na interface materno-fetal

No segundo grupo de animais, predominou a marcação epitelial uterina (Figuras 13A, 13B), sendo rara no lado fetal e pouco incidente concomitantemente em ambos os compartimentos. As células gigantes predominam no epitélio uterino, mas também foram encontradas no trofoblasto (Figuras 13A, 13B, 13C, 13D), especialmente binucleadas. Corpúsculos apoptóticos foram encontrados tanto no epitélio uterino quanto no trofoblástico, em quantidades semelhantes. Houve bastante marcação tanto no estroma endometrial (Figura 13D), quanto no mesênquima. O tecido conjuntivo apresentou alta celularidade (Figura 13D). Ocasionalmente observou-se marcação do endotélio materno.

Os núcleos das células apoptóticas apresentaram cromatina condensada e picnose (Figura 13D).

Figura 13 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 2º grupo de animais

A, B = Marcação predominante no epitélio uterino (Eu). Presença de células binucleadas (Bi), e multinucleadas (*) marcadas

C =Células gigantes (CG) marcadas em ambos os compartimentos placentários (setas)

D =Estroma endometrial com alta celularidade (ES). Células apoptóticas apresentando picnose nuclear e cromatina condensada (*). Presença de células gigantes (setas)

No terceiro grupo de animais, todos os animais exibiram marcação no epitélio uterino, especialmente nas áreas de contato entre os dois epitélios. As células gigantes expressando neoepítomos de citoqueratina 18 estiveram presentes em ambos os epitélios (Figura 14A, 14D), em grandes quantidades, às vezes com marcação nuclear (Figura 14B). A presença de corpúsculos apoptóticos (Figura 14B, 14C) foi detectada de modo semelhante em ambos os compartimentos. Quase todos os animais apresentaram estroma endometrial (Figura 14A) e mesênquima fetal marcados. Houve marcação de algumas células endoteliais maternas e fetais. A apoptose foi evidenciada morfológicamente pela condensação da cromatina (Figura 14A) e picnose nuclear.

Figura 14 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 3º grupo de animais

A= Presença de células binucleadas (Bi) marcadas no epitélio uterino (Eu) e célula apoptótica com cromatina condensada (*). Marcação do estroma endometrial (ES)

B = Abundância de células gigantes, algumas com marcação nuclear(*); corpúsculos apoptóticos (CA) no trofoblasto (Tr)

C =Corpúsculos apoptóticos no epitélio uterino (Eu)

D =Presença de célula multinucleada (*) marcada em epitélio uterino (Eu)

No quarto grupo, a marcação ocorreu tanto no epitélio uterino quanto no trofoblasto, e nas áreas de contato entre mãe e feto (Figuras 15C, 15D). Células gigantes foram observadas no epitélio trofoblástico e uterino (Figuras 15A, 15B, 15C, 15D), igualmente distribuídas em ambos os compartimentos, sendo que, no lado fetal, percebeu-se marcação nuclear (Figuras 15B, 15D).

Corpúsculos apoptóticos estiveram presentes em maior quantidade no trofoblasto ou na área de contato entre mãe e feto (Figura 15A). Houve ocorrência de marcação estromal (Figuras 15A, 15B) e mesenquimal (Figura 15A).

Observou-se ocorrência de marcação no endotélio materno.

Observou-se ainda cromatina condensada e núcleos picnóticos como sinais morfológicos de apoptose.

Os controles negativos estão expressos na Figura 16.

A análise estatística revelou um aumento significativo de apoptose do primeiro grupo em relação ao quarto grupo ($p < 0.05$, testes de ANOVA e de Newman-Keuls) (Gráfico 2).

Figura 15 - Fotomicrografias mostrando a expressão de M30 em placenta de búfalas no 4º grupo de animais

- A = Presença de células gigantes (*) nos dois epitélios (Eu/Tr). Estroma endometrial marcado (setas). Corpúsculo apoptótico (CA) no trofoblasto (Tr)
- B = Marcação nuclear das células gigantes (*). Estroma endometrial marcado (setas)
- C = Marcação do epitélio uterino evidente (setas)
- D = Marcação do vilão materno (VM) em contato com o vilão trofoblástico (VT)

Figura 16 - Fotomicrografias mostrando controles negativos de M30 em placenta de búfalas, para diferentes grupos de animais

(sendo **A** , 1º grupo, **B**, 3º grupo, e **C**, 4º grupo)

Gráfico 2 - Análise semi-quantitativa da expressão de M30

(mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) em células de placenta de búfala em diferentes períodos gestacionais
 N = N° de animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao 1° terço gestacional (testes de ANOVA e Newman-Keuls)

5.2 DETECÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM PLACENTA DE BÚFALA

Foi detectada a presença de núcleos marcados com o anticorpo de proliferação nuclear na placenta ao longo de toda a gestação.

A intensidade de marcação do anticorpo PCNA variou de acordo com o período gestacional estudado. Houve positividade em todos os casos estudados (Anexo 4) .

As estruturas placentárias observadas quanto à ocorrência desta marcação foram as mesmas descritas para a pesquisa de apoptose.

5.2.1 PCNA

No primeiro grupo observou-se que a área de marcação predominante foi a de contato entre os epitélios uterino e trofoblástico (Figuras 17B, 17D). Praticamente todos os campos apresentavam marcação em estroma uterino e mesênquima fetal, muitas vezes fortemente, com alta celularidade do lado materno (Figura 17A). Houve ocorrência de marcação no endotélio materno (Figura 17B). Fileiras de células marcadas foram vistas no compartimento materno (Figuras 17A, 17B, 17C, 17D). Quanto às células gigantes marcadas, estiveram presentes em ambos os epitélios, sendo em maior quantidade no trofoblástico (Figuras 17B, 17C, 17D).

Figura 17 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 1º grupo de animais

A =Estroma endometrial (ES) e mesênquima fetal marcados (M). Observar a alta celularidade presente

B =Destaque para marcação do endotélio fetal (setas)

C, D =Fileiras de células marcadas no epitélio uterino (Eu) e no Trofoblasto (Tr) (setas). Presença de células gigantes predominantemente no trofoblasto (Tr) (*)

O segundo grupo apresentou predomínio de marcação igual ao do primeiro , privilegiando a área de intersecção entre mãe e feto (Figura 18A). O estroma endometrial esteve quase sempre marcado, enquanto que também houve incidência de marcação mesenquimal. Notou-se bastante celularidade em ambos os tecidos conjuntivos. Células gigantes marcadas foram observadas em ambos os compartimentos (Figuras 18B, 18C).

Figura 18 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 2º grupo de animais

A = Marcação da zona de contato entre mãe e feto Vt/Vm

B, C = Presença de células gigantes (*) marcadas em ambos os epitélios (Tr/Eu)

Houve ocorrência de marcação no terceiro grupo na área de contato entre mãe e feto. Percebeu-se marcação estromal e mesenquimal de modo semelhante e raras ocorrências de marcação endotelial, do lado materno. As células gigantes binucleadas foram vistas tanto no trofoblasto quanto no epitélio uterino. (Figuras 19A, 19B e 19C).

Figura 19 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 3º grupo de animais

A, B=Marcação da zona de contato entre mãe e feto (MF)

B, C =Presença de células gigantes (*) marcadas em ambos os epitélios (Tr/Eu)

O quarto grupo revelou marcação predominante no epitélio materno em praticamente metade dos animais, e em ambos os compartimentos, para a outra metade. O estroma endometrial apresentou maior marcação que o mesênquima, onde percebeu-se também marcação endotelial. Marcação de células gigantes foi observada em ambos os compartimentos, em semelhantes quantidades; no entanto, células binucleadas foram encontradas em maior número no trofoblasto. (Figuras 20 A, 20 B)

Ocorreu uma diminuição no número de células estatisticamente significativa dos dois primeiro grupos de animais em relação ao quarto grupo (0.05, testes de ANOVA e de Newman-Keuls) (Gráfico 3).

Figura 20 - Fotomicrografias mostrando a expressão de PCNA em placenta de búfalas no 4º grupo de animais. Destaques para

A = Marcação da interface materno-fetal (setas)

B = Marcação de células gigantes (*)

Figura 21 - Fotomicrografia mostrando os controles negativos de PCNA em placenta de búfala nos diversos grupos estudados

A, Representante do 1º grupo; B, 2º grupo; C, 3º grupo; D, 4º grupo, respectivamente

Gráfico 3 - Análise semi-quantitativa da expressão de PCNA

(mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) em células de placenta de búfala em diferentes períodos gestacionais

N = N° de animais por grupo. * # $p < 0,05$ em relação ao 1º e 2º terço gestacional (testes de ANOVA e Newman-Keuls)

5.3 DETECÇÃO DE APOPTOSE POR MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (EOSINOFLUORESCÊNCIA)

Os cortes de tecido corados com hematoxilina de Harrys e eosina apresentaram intensa eosinofluorescência nas áreas onde havia células em apoptose e corpúsculos apoptóticos sob microscopia de luz; quando submetidas estas mesmas áreas à luz fluorescente, observou-se intensa coloração verde citoplasmática e pôde-se ainda verificar morfologia característica nestas células em processo de morte celular, como condensação da cromatina nuclear, núcleos em picnose, além dos próprios corpúsculos apoptóticos.

Células em apoptose foram evidenciadas em todos os estágios gestacionais (Figura 22).

*

Figura 22 - Fotomicrografias mostrando correspondência entre células com morfologia sugestiva de apoptose, apresentando-se eosinofluorescentes (A-D), e a coloração verde citoplasmática fluorescente (A2-D2), nos diversos grupos de animais estudados. Corpúsculos apoptóticos (setas) podem ser facilmente identificados, além da condensação da cromatina (*)

6. DISCUSSÃO

O sistema reprodutor, assim como a placenta dos búfalos apresentam grandes semelhanças com a espécie bovina (VALE, 1988; HAFEZ, 2004), podendo esta última ser classificada como indecídua (GRUNERT; BIRGEL, 1982; MIES FILHO, 1987; MOSSMAN, 1987), múltipla ou cotiledonária (AMOROSO, 1952; GRUNERT; BIRGEL, 1982; MOSSMAN, 1987; MIES FILHO, 1987; TACHI; STRAUSS, 1987; SCHLAFFER, 2000) , vilosa (AMOROSO, 1952; GRUNERT; BIRGEL, 1982; BANKS, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994) e sinepiteliocorial (WOODING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994; CARVALHO, 2000; SCHLAFFER, 2000; IGWEBUIKE, 2005), apesar das divergências entre os autores entre os termos epiteliocorial , sindesmocorial e o primeiro (WIMSATT, 1980; GRUNERT; BIRGEL, 1982; WOODING, 1982; ROBERTS, 1986; MOSSMAN, 1987; TACHI; STRAUSS, 1987; KAUFMANN; BURTON, 1994; GEORGE; CASTRO, 1998; SCHLAFFER, 2000).

Sabe-se que a vaca, no início da gestação, apresenta uma placenta do tipo epiteliocorial, com todas as seis camadas que compõem a barreira hemato-placentária ou interhemática . Com o progresso gestacional, a placenta torna-se sinepiteliocorial, devido à migração das células gigantes trofoblásticas binucleadas para o epitélio uterino (SIMÕES, 1984; LEISER; KAUFMANN, 1994). De acordo com PEREIRA (2001), a fim de se optar com exatidão entre uma e outra, haveria a necessidade de maiores estudos direcionados à migração placentária das células gigantes. Mais recentemente, IGWEBUIKE (2005), após extensa revisão sobre o papel das células trofoblásticas na placenta, reafirma a placenta de ruminantes como sendo, histologicamente, sinepiteliocorial.

A apoptose, também conhecida como “morte celular programada” por ser um fenômeno ordenado e geneticamente controlado (LOCKSHIN, 1964; GEWIES;

GRIMM, 2003), foi descrita bioquímica e fisiologicamente por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 (AMARANTES-MENDES, 2003). Apresenta papel fundamental na homeostase tissular de organismos multicelulares (BOWEN, 1993; MAJNO; JORIS, 1996). Foi descoberta em tecidos em atrofia (KERR, 1972; MAJNO e JORIS, 1985), atuando também no desenvolvimento, remodelamento e senescência placentários, uma vez que a placenta é um órgão temporário. O crescimento placentário e fetal, e a nutrição deste último, requerem altas taxas de “turnover” celular. Além disso, a maturação da placenta está correlacionada à redução das células epiteliais das criptas carunculares, a fim de que ocorra o delivramento das membranas fetais, evitando retenção (BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003). A placenta, portanto, atravessa todas estas etapas num período de 10 meses e meio, aproximadamente, em se tratando da gestação da búfala (HAFEZ, 2004), e pode ser considerada como um modelo para estudos de apoptose e proliferação celular.

A presença de células gigantes trofoblásticas na placenta de búfalas foi observada durante toda a gestação, em ambos os compartimentos, materno e fetal, o que concorda com os achados de Wooding (1982), Carvalho (2000). Observou-se ainda a presença de células multinucleadas, as quais, em bovinos e ovinos, caracteriza a fusão das células binucleadas fetais com as do epitélio uterino (AMOROSO, 1952; WINSATT, 1980; KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982 ; WOODING et al, 1997; LEISER; KAUFMANN, 1994; KLISCH et al., 1999).

Estudos quantitativos em células binucleadas revelaram diminuição destas com o avançar da gestação (TAYLOR, 1980; GROSS, WILLIAMS; RUSSEK-COHEN, 1991; MARQUES JÚNIOR; ANDRADE; BARRETO FILHO, 1992; SANTOS et al., 1996), tentando estabelecer relação entre o fenômeno e a ocorrência de retenção placentária, mas Carvalho (2000) não observou este declínio celular em

placentas bubalinas; embora tenhamos feito uma contagem semiquantificativa, nossos resultados concordam com os da autora, apoiando-se ainda em outros estudos realizados por Navarro (2002), que relataram não ser o búfalo um animal mais resistente à retenção de secundinas, como pensa-se a nível de campo, talvez devido à sua rusticidade. Talvez a marcação destas em nosso trabalho, especialmente nos meses que antecedem de modo mais imediato o parto, esteja relacionada às funções que ela exerce na placenta, como remoção e reposição do epitélio uterino (AMOROSO, 1952; WHATES; WOODING, 1980; KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982), produção de gonadotrofinas coriônicas (BJÖRKMAN, 1954) e transporte de lactogênio placentário (STEVEN et al., 1978; WOODING; WATHES, 1980; DUELLO; BYATT; BREMEL, 1986), as quais vão tornando-se obsoletas com o avançar da gestação.

O estroma endometrial e o mesênquima fetal são ricamente vascularizados, apresentando grande aumento no número de capilares com a avançar da prenhez (PEREIRA, 2001). Além disso, apesar da capacidade de proliferação das células do estroma ser relativamente baixa, há o aumento tecidual pela produção de fibras conjuntivas (BOOS; STELLJES, 2000) e talvez por isso possamos explicar a ocorrência de marcação tanto para apoptose, embora em menor freqüência, como também relatam Austgulen et al. (2002), quanto para proliferação celulares.

O padrão morfológico das células em apoptose na placenta, como cromatina condensada, picnose nuclear, presença de corpúsculos apoptóticos, obedeceu às descrições observadas na literatura (KERR et al., 1987; 1995; KERR, 2002).

A expressão de Caspase-3 Clivada e M30 na placenta demonstraram a presença de células em apoptose durante todo o período gestacional estudado, que compreende do segundo ao décimo mês, aproximadamente. Para a Caspase-3

Clivada, os graus de intensidade de marcação variaram significativamente entre os três primeiros grupos de animais e o último, representante da placenta a termo; entretanto, no caso do M30, a diferença estatística foi somente observada entre o primeiro e o quarto grupo. Nossos achados concordam com os de vários outros autores (SMITH; BAKER; SYMONDS, 1997; LEERS et al., 1999; PFARRER et al., 1999; AUSTGULEN et al., 2002), os quais sugerem a ocorrência de um maior número de células em apoptose com o avanço gestacional, uma vez que esta concorre para a desconexão entre os tecidos materno e fetal ao término da gestação. Segundo Pfarrer et al. (1999), a apoptose no decorrer da gestação pode mesmo estar envolvida no remodelamento do órgão e homeostase tissular, mas ao final sugere uma função de eliminação das células produtoras de sinais progestagênicos.

A marcação de apoptose por nós observada concentrou-se fundamentalmente nos epitélios, tanto trofoblástico, quanto uterino (JOSWIG et al., 2003; VON RANGO, 2003), e no citoplasma celular, como seria o esperado para os tipos de anticorpos utilizados. Apesar disso, foram verificadas algumas ocorrências de marcação nuclear. Uma possível explicação seria o fato dos eventos apoptóticos apenas iniciarem-se no citoplasma, continuando no núcleo, onde a morte celular teria a sua consolidação (HUPPERTZ, 1999; KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001). As células em estágios apoptóticos mais avançados apresentariam esta dupla marcação, provavelmente antecipando a fragmentação nuclear. Na grande maioria das vezes as células apoptóticas marcadas citoplasmaticamente encontravam-se nos estágios iniciais da cascata apoptótica, logo após a ativação das caspases executoras (no caso, caspase-3), posto que a clivagem caspase

mediada da citoqueratina 18 é bastante anterior à ação das endonucleases que atuam sobre o DNA (KADYROV; KAUFMANN; HUPPERTZ, 2001).

Os anticorpos utilizados (M30 e Caspase-3 Clivada) marcam preferencialmente células epiteliais, posto que são ricas em citoqueratina 18, proteína dos filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto (YOUNG; HEATH, 2001). Além da alta especificidade destes anticorpos, há que se ressaltar a ocorrência do completo desarranjo estrutural a que é submetida a célula em apoptose (KERR, 1987; 1995; MAJNO; JORIS, 1985; CAULIN; SALVENSEN; OSHIMA, 1997).

Observou-se um aumento na quantidade/intensidade de marcação para M30 e caspase-3 clivada em placentas provenientes dos últimos grupos gestacionais, compatível com a incidência maior de apoptose. Devido à fagocitose que ocorre ao término do processo (FADOK et al., 1992; VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002), podemos também inferir que estas células devam ter sido capturadas e catabolizadas por macrófagos, menos do que por células epiteliais vizinhas, em analogia aos estudos de Schlafer (2000), que refere um aumento dez vezes maior no número de macrófagos na placenta a partir do oitavo mês de gestação.

No que se refere à proliferação celular, encontramos por meio do uso do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) uma diferença significativa entre os dois primeiros grupos e o último, demonstrando uma diminuição do número de células proliferativas, o que é fisiologicamente aceitável na placenta, e concorda com os achados em placentas humanas de Maruo et al. (2000), que descrevem um declínio acentuado nas células do citotrofoblasto em proliferação. Consideramos como positivas apenas as células com núcleos marcados (NOVELLINO et al., 2003), por ser este um marcador de antígeno nuclear específico (ALVES; BACCHI; VASSALO,

1999). Segundo BJÖRKMAN (1969), células em proliferação indicam sua participação na nutrição do conceito; em assim sendo, num momento gestacional em que o feto já se encontra totalmente desenvolvido e prestes a deixar a cavidade uterina, não haveria mesmo significado fisiológico na manutenção ou continuação do processo proliferativo.

A evidenciação de células com morfologia típica de apoptose e intensa eosinofilia em cortes corados com HE, sob microscopia de luz transmitida, baseando-se nas propriedades eosinofluorescentes dos corpúsculos apoptóticos, foi observada em nosso estudo, concordando com autores pioneiros nesta técnica (STINCHCOMBE et al., 1995; WOOD; SARMA; ARCHER, 1999). Pudemos verificar a presença de corpúsculos apoptóticos de coloração esverdeada fluorescente intensa, correspondente às mesmas células pesquisadas e coradas em HE. Sendo a eosina um corante ácido, afina-se à estruturas básicas e de cargas positivas, tais como mitocôndrias e proteínas citoplasmáticas, quando o corte é visto ao microscópio de fluorescência. O DNA aparece em tonalidade amarelo-esverdeado fluorescente, evidenciando o núcleo (YOUNG; HEATH, 2001). O mesmo autor relata a característica histológica de células em apoptose, referindo-se ao intenso aumento da eosinofilia citoplasmática, provavelmente pela dissolução da membrana nuclear e extravasamento do conteúdo nuclear no citoplasma da célula, antes de haver uma reorganização e o empacotamento de suas várias estruturas em corpúsculos apoptóticos, que serão futuramente fagocitados por células vizinhas ou macrófagos.

7. CONCLUSÕES

1. A detecção de células apoptóticas por meio dos anticorpos monoclonal M30 CytoDeath e policlonal caspase-3 clivada foi observada em todos os grupos de animais estudados e ao longo de todo o período gestacional, com um aumento estatisticamente significativo ($p < 0.05$) na placenta a termo.

2. O antígeno nuclear de proliferação celular nos permitiu acessar as células em proliferação ao longo de toda a gestação, havendo uma diminuição celular significativamente estatística na fase final da gestação ($p < 0.05$), em relação ao início da gestação.

3. Pôde-se observar a ocorrência de corpúsculos apoptóticos em cortes corados com HE, de acordo com suas propriedades eosinofluorescentes, durante toda a gestação.

4. Nossos resultados nos permitem inferir uma possível correlação entre o desenvolvimento, senescência e liberação placentários e o fenômeno da apoptose.

REFERÊNCIAS

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270 p.

AMARANTES-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15-18, 2003.

AMARANTES-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p. 1053-1061, 1999.

AMOROSO, E.C. Placentation. *In*: **Marshall's Physiology of Reproduction**, 3. ed. London: Longmans, 1952. p. 127-311.

AMOROSO, E. C.; PERRY, J.S. The existence during gestation of an immunological buffer zone at the interface between maternal and foetal tissues. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 271, p. 343-361, 1975.

ANTHONY, R. V.; LIANG, R.; KAYL, E. P.; PRATT, S. L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 83-95, 1995. Suppl.

Apoptosis. Disponível em
<<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>>.
Acesso em 25/06/2003

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v.281, p.1305-1308, 1998.

AUSTGULEN, R.; ISAKSEN, C. V.; CHEDWICK, L.; ROMUNDSTAD, P.; VATTEN, L.; CRAVEN, C. Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 61, p. 39-50, 2004.

AUSTGULEN, R.; CHEDWICK, L.; ISAKSEN, C.V.; VATTEN, L.; CRAVEN, C. Trophoblast apoptosis in human placenta at term as detected by expression of a cytokeratin 18 degradation product of caspase. **Archives of Pathology of Laboratory Medicine**, v. 126, p. 1480-1486, 2002.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565-584.

BANTEL, H.; RUCK, P.; GREGOR, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, p. 230-239, 2001.

BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Aspectos histológicos da placenta de vacas Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 385-393, 1993.

BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Alguns aspectos histofisiológicos do placentomo de vaca zebu (*Bos taurus indicus*) no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 3-4, p. 161-164, 1995.

BENESCH, F. Tratado de obstetricia y ginecologia veterinarias. Barcelona : **Labor**, 1963. p. 77.

BJÖRKMAN, N. Fine structure of the cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 24, p. 249-258, 1968.

BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Record**, v. 163, p. 17-30, 1969.

BJÖRKMAN, N. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta anatomica**, v. 22, p. 1-91, 1954. Supl. 22.

BJÖRKMAN, N. H.; SOLLEN, P. A morphological study on retention secundinarum in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 2, p. 347-362, 1961.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

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.

BOOS, A.; STELLJES, A. Immunohistochemical detection of collagen types I, III and IV in the bovine uterus during pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 174-175, 2000.

BOSHIER, D. P. A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 19, p. 51-61, 1969.

BOWEN, I. D. Apoptosis or programmed cell death? **Cell biology international**, v. 17, p. 365-380, 1993.

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

CAULÍN, C.; SALVESEN, G. S.; OSHIMA, R. G. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 6, p. 1379-1394, 1997.

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

DAVIES, J.; WIMSATT, W. A. Observations on the fine structure of the sheep placenta. **Acta anatomica**, v. 65, p. 182-223, 1966.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 377-380.

DOERFLER, P.; FORBUSH, K. A.; PERLMUTTER, R. M. Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. **Journal of Immunology**, v.164, n.8, p.4071-4079, Apr 2000.

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

EASTMAN, A. Apoptosis: A product of programmed and unprogrammed cell death. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.121, p. 160-164, 1993.

EILER, H. Retained placenta, *In*: YOUNGQUIST, R. S. Current therapy in large animal theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 1997. p. 340-349.

ENGELAND, M.; VAN NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELING-SPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assays: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.

FAO (Food and Agriculture Organization), FAOSTAT - Agriculture data. Disponível em: <<http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>>. Acesso em: 2005.

FERRELL, C. L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1945-1953, 1991.

FLEMMING, W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugetiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch*, p. 221-244, 1885.

FINDLAY, J. K. **Molecular biology of the female reproductive system**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 395-440.

FLOOD, P. F. The development of the conceptus and its relationship to the uterus. In: CUPPS, P.T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic Press, 1991. p. 315-356.

FRANK, H. G.; GENBACEV, O.; BLASCHITZ, A. et al. Cell culture models of human trophoblast – primary culture of trophoblast – a workshop report. **Placenta**, v. 21, Suppl. A, p. 120-122, 2000.

GEWIES, A.; GRIMM, S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. **Bros. J. Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1574-1580, Oct. 2003.

GOWN, A. M.; WILLINGHAM, M. C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 4, p. 449-454, 2002.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v. 21, p. 1465-1468, 1995.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GREEN, J. A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1624-1631, 2000.

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

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. **Obstetrícia Veterinária**. Porto Alegre: Editora Sulina, 1982. p. 27-138.

GUILLOMOT, M.; FLÉCHON, J.E.; WINTENBERG-TORRÈS, S. Conceptus attachment in the ewe: an structural study. **Placenta**, v. 2, p. 169-182, 1981.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 127-171.

HAIGH, T.; CHEN, C.; JONES, C. J.; APLIN, J. D. Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. **Placenta**, v. 20, n. 8, p.615-625. Nov. 1999.

HARRISON, D.J. Cell death in the diseased glomerulus. **Histopathology**, v.12, p. 679-683, 1988.

HUPPERTZ B.; HUNT, J.S. Trophoblast apoptosis and placental development--a workshop report. **Placenta**, v.21, p.S74-76, Mar-Apr 2000. Suppl A.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; REISTER, F.; KINGDOM, J.; KORR, H.; KAUFMANN, P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. **Lab Invest.** v. 79, n. 12, p. 1687-1702, Dec. 1999.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H.G.; KINGDOM, J.C.; REISTER, F.; KAUFMANN, P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. **Histochem Cell Biol.** v. 110, n. 5, p. 495-508, Nov. 1998.

HUPPERTZ, B.; TEWS, D.S.; KAUFMANN, P. Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. **Int Rev Cytol.**, v. 205, p. 215-253. 2001.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível em:<<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em: 2003.

Introdução à apoptose. Disponível em: <<http://morpheus.fmrp.usp.br/biocell/introapoptose.htm>>. Acesso em 13/12/2002.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas – a minireview. **Animal Reproduction Science**, Article in Press, p. 1-14, 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 185-193, 2000.

JOOSTEN, I., HENSEN, E.J. Retained placenta: an immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451-461, 1992.

JOSWIG, A.; GABRIEL, H.D.; KIBSCHULL, M.; WINTERHAGER, E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-9, 2003.

KADYROV, M.; KAUFMANN, B.; HUPPERTZ, B. Expression of a cytokeratin 18 neo-epitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. **Placenta**, v.22, p. 44-48, 2001.

KATHIRESAN, R.; RAJASUNDARAM, R.C.; PATTABIRAMAN, S.R. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, v. 69, p.326-328, Apr. 1992.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: **The Physiology of Reproduction**, 2. ed. New York : Raven Press, 1944. p. 441-484.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J.; HARMON, B. V.; BISHOP, C. J. Apoptosis. In: **Perspectives on mammalian cell death**, Oxford : Oxford University Press, 1987. p. 93-128.

KERR, J. F. R.; GOBÉ, G.C.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Anatomical methods in cell death, In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. (Ed.). *Cell death*. San Diego: Academic Press , 1995. p.1-39. (**Methods in cell biology, 46**)

KERR, J. F. R. History of events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 181-182, p. 471-474, 2002.

KING, G.J.; ATCKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome during second month of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, p.95-100, 1980.

KING, G.J., ATCKINSON, B.A., ROBERTSON, H.A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p. 17-30,1982. Suppl.

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMAN, B.; LEISER, R. Tripolar acynetics mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of generation of multinuclear cells. **Anatomic Embriology**, v. 200, p. 229-237, 1999.

KOENIG, J.M.; CHEGINI, N. Enhanced expression of Fas-associated proteins in decidual and trophoblastic tissues in pregnancy-induced hypertension. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 44, p. 347-349, 2000.

KOTHAKOTA, S.; AZUMA T.; REINHARD C.; KLIPPEL A.; TANG J.; CHU K.; MCGARRY T. J.; KIRSCHNER M. W.; KOTHS K.; KWIATKOWSKI D. J.; WILLIAMS L. T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. **Science**, v. 278, p. 294-298, 1997.

KU, N. O.; OMARY, M. B. Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, p. 161-71, 1994.

LAVEN, R. A.; PETERS, R. A. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 289-296, 2001.

LEE, C. S.; GOGOLIN-EWENS, K.; WHITE, T. K.; BRANDON, M. R. Studies on the distribution of binucleate cells in the placenta of sheep with a monoclonal antibody SBU3. **Journal of Anatomy**, v. 140, p. 565-576, 1985.

LEERS, M. P. G.; KÖLGEN, W.; BJÖRKLUND, V.; BERGMAN, T.; TRIBBICK, G.; PERSSON, B.; BJÖRKLUND, P.; RAMAEKERS, F. C. S.; BJÖRKLUND, B.; NAP, M.; JÖRNVALL, H.; SCHUTTE, B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. **Journal of Pathology**, v.187, p. 567-572, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. ; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 364-377.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nature Reviews. **Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 589-98, 2001.

LIAO, J. KU; N. O.; OMARY, M. B. Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. **J Biol Chem**. v. 272, n.28, p. 17565-17573. July 1997.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells. **Biochem Cell Biol**. v. 72, p. 589-596. Nov-Dec 1994.

LOURES , R.R. Buffalo production systems in Americas *In*: World Buffalo Congress , 6., 2001, Maracaibo. **The Bufallo: an alternative for animal agriculture in the third millennium**. Maracaibo: ASOBUFALO, 2001. v. 1, p. 74-86.

MAJNO, G.; JORIS, I.; Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p.3-15, 1995.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues, and disease**: principles of general pathology. Cambridge, Mass.: Blackwell Science, p. 175-227, 1996.

MALARD, J. B.; BARRETO FILHO, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas zebu ao longo da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 5, p. 553-558, 1996.

MANCINI, M.; NICHOLSON, D. W.; ROY, S.; THORNBERRY, N. A.; PETERSON, E. P.; CASCIOLA-ROSEN, L. A.; ROSEN, A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. **The Journal of Cell Biology**. v. 140, p. 1485-1495, Mar 1998.

MAJEWSKA, M.; PANASIEWICZ, G.; DABROWSKI, M.; GIZEJEWSKI, Z.; BECKERS, J. F.; SZAFRANSKA, B. Multiple forms of Pregnancy-Associated Glycoproteins released in vitro by porcine chorion or placental and interplacental explants of wild and domestic ruminants. **Reprod Biol**, v. 5, p. 185-203, July 2005.

MARGARETH, C.; WINKERFORD, C. M.; WALKER, N. I. et al. Apoptosis. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 21, p. 88-101, 1997.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; ANDRADE, J. S.; BARRETO FILHO, J. B. Histologia da placenta da cabra (*Capra hircus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n.1, p. 43-48, 1992.

MARUO, T.; ISHIHARA, N.; SAMOTO, T.; MURAKOSHI, H.; LAOAG-FERNANDEZ, J. B.; MATSUO, H. Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. *In*: WORLD CONFERENCE ON EARLY PREGNANCY, 4., 2001, Hungary. v.5, p. 28-29.

MATAMOROS, R. A.; CAAMANO, L.; LAMB, S. V.; REIMERS, T. J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 486-492, 1994.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 1.

MIGHELL, A. PCNA and p53. *Eur J Câncer Part B Oral Oncol*, v. 31B, p. 403-404, 1995.

MIRANDA, W. C. **Criação de búfalos no Brasil**. São Paulo: Editora dos Criadores, 1986. 173 p.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 2228-2234, 1978.

MORGAN, G.; WOODING, F. B. P. Cell migration in the ruminant placenta, a freeze fracture study. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 83, p. 148-160, 1983.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. 383 p.

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

NAVARRO, S. D. **Bovinos nelore (*Bos indicus*) e Bubalinos (*Bubalus bubalis*). São estes animais mais resistentes à retenção de placenta? Por que?** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. Trends in Biochem. **Science**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NOVELLINO, A. T. N.; AMORIM, R. F. B.; QUEIROZ, L. M. G.; FREITAS, R. A. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.18, n.5, p.458-464, Out. 2003.

NÚÑEZ PIÑERO, L. O. **Bufalo: el increíble**. Valencia: L.O.M.P., 2000. 139 p.

OMARY, M. B.; KU, N. O.; LIAO, J.; PRICE, D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 31, p. 105-140, 1998.

OSHIMA, R. G. Apoptosis and keratin intermediate filaments. **Cell Death Differ.**, v.9, n. 5, p. 486-492, May 2002.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A. F.; BEVILACQUA, E. Development of placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis* – Linnaeus, 1758. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v.38, p. 151-154, 2001.

PETER, M. E.; HEUFELDER, A. E.; HENGARTNER, M. O. Advances in apoptosis research. **Proceedings of the National Academic Science**, v.94, p.12736-12737, 1997.

PFARRER, C.; WIRTH, C.; SCHULER, G.; KLISCH, K.; LEISER, R.; HOFFMAN, B. Frequency, ultrastructural features, and relevance of apoptosis in the bovine placenta. **Biol Reprod**, v. 60, p. 222, 1999. Supplement 1.

RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies of the placenta of bufallo (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal of Animal Sciences**, v.61, n.8, p. 841-842, 1984.

RANJHAN, S.K. Changing role of buffalo production in the third millenium. *In*: World Buffalo Congress , 6., 2001, Maracaibo. **The Bufallo: an alternative for animal agriculture in the third millennium**. Maracaibo: ASOBUFALO, 2001. v. 1, p. 155-171, 2001.

REYNOLDS, S. R. M. **Physiology of the uterus**. 2. ed. New York:Paul B. Hoeber, 1949. p. 539-540.

REYNOLDS, L. P.; MILLAWAY, D. S.; KIRSCH, J. D.; INFELD, J. E.; REDMER, D. A. Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 213–222, 1990.

RIBEIRO, A. A. C. M. Estudo anatômico dos gânglios celíaco, celíaco-mesentérico e mesentérico cranial e de seus componentes aferentes em fetos de búfalos (*Bubalus bubalis* ¾ Linnaeus, 1758), 1998. 182 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

RICHTER, J.; GÖETZE, R. **Tiergeburtshilfe**. 3. ed. Berlin: Parey , 1978. p. 15-43.

RILEY, S. C.; WEBB, C. J.; LEASK, R.; McCAIGH, F. M.; HOWE, D. C. Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodeling in the sheep placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.19-27, 2000.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetric and genital diseases (theriogenology)**. 3. ed. Woodstock, Vt.: David and Charlies, 1986. 986p.

ROBERTS, R. M.; ANTHONY, R. V. **Molecular biology of trophectoderm and placental hormones in molecular biology of the female reproductive system**, Findlay: Academic Press, 1994.

RUDEL, T.; BOKOCH, G. M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. **Science**, v. 276, p. 1571–1574, 1997.

SAMALI, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; JONES, D. P.; ORRENIUS, S. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. **FEBS Letters**, v. 431, p. 167-169, 1998.

SANDERS, E. J.; WRIDE, M. A. Programmed cell death in development. Review. **International Review of Cytology**, v. 163, p. 105-173, 1995.

SANTOS, R. L.; BARRETO-FILHO, J. B.; MARQUES, A. P.; ANDRADE, J. S. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. **Theryogenology**, v. 46, p. 1077-1083, 1996.

SCHAAFSMA, H. E.; RAMAEKERS, F. C. Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. **Pathol Annu.**, v. 29, p. 21-62, 1994.

SHAH, M.; STANEK, J. HANDWERKER, S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. **Histochemical Journal**, v. 30, p. 509-518, 1998.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 145-160, 2000.

SCHOON, H. A. **Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität**. Habilitation Thesis, School of Veterinary Medicine, Hannover, p. 114-125, 1989. (*apud* BOOS, 2003)

SCHUTTE, B.; HENFLING, M.; KÖLGEN, W.; BOUMAN, M.; MEEX, M.; LEERS, M.P.G.; NAP, M.; BJÖRKLUND, V.; BJÖRKLUND, P.; BJÖRKLUND, B.; LANE, E. B.; OMARY, M. B.; JÖRNVALL, H.; RAMAEKERS, F. C. S. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. **Experimental Cell Research**, v.297, p.11-26, 2004.

SIMÕES, J. M. C. **Fisiologia da reprodução dos ungulados domésticos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1984. p. 428-502.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3, 6, and 7 perform distinct, nonredundant roles during the demolition phase of apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 7320-7326, 2001.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 177, p. 57–65, 1997.

SOBIRAJ, A. Untersuchungen zur morphologie sowie zur histochemie und biochemie des uterus bei rindern in der frühen postpartalen periode. Habilitation Thesis, University of Giessen, 1992.

SOBIRAJ, A.; WARKO, G.; LEHMANN, B.; BOSTEDT, H. Weak viability syndrome in newborn foals. Retrospective studies of the etiological clarification and chance for recovery. **Tierärztliche Praxis**, v. 20, p. 287-291, June 1992.

STALLMACH, T.; HEBISCH, G.; MEIER, K.; DUDENHAUSEN, J. W.; VOGEL, M. Rescue by birth: detective placental maturation and late fetal mortality. **Obstetrics and Gynecology**, v. 97, p. 505-509, 2001.

STEVEN, D.H.; BASS, F.; JANSEN, C.J.; KRANE, E.J.; MALLON, K.; SAMUEL, C.A.; THOMAS, A.L.; NATHANIELSZ, P.W. Ultrastructural changes in the placenta of the ewe after fetal pituitary stalk section. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 63, p. 221-229, July 1978.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K. W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v.16, n.6, p.1271-1275, 1995.

SUN, S. S.; HSIEH, J. F.; TSAI, S. C.; HO, Y. J.; LEE, J. K.; KAO, C. H. Cytokeratin fragment 19 and squamous cell carcinoma antigen for early prediction of recurrence of squamous cell lung carcinoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 241-243, 2000.

TACHI, C.; STRAUSS, J. F. Placenta. *In: Atlas of Endocrine Organs of Vertebrates and Invertebrates*. Springer-Verlag, 1987. 307 p.

TAYLOR, M. J. T. **Studies on the physiology of placental lactogen in the sheep**. PhD thesis, Oxford University, 1980.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281,p. 1312-1316, Aug 1998.

VALE, W. G. **Bubalinos: fisiologia e fatologia da reprodução**. Campinas: Fundação Cargill, 1988, 86 p.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomical and Histological Embriology**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

VAN ENGELAND, M.; KUIJPERS, H. J.; RAMAEKERS, F. C.; REUTELINGSPERGER, C.P.; SCHUTTE, B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 235, p. 421-30, Sep 1997.

VERHAEGEN, S. Microscopical study of cell death via apoptosis. **European Microscopy Analysis**, v. 51, p. 31-33, 1998.

VON RANGO, U.; KRUSCHE, C. A., KERTSCHANSKA S, ALFER J, KAUFMANN P, BEIER, H. M. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. **Placenta**, v. 24, p. 924-940, 2003.

WALKER, P.R.; WEAVER, V.M.; LACH B.; LEBLANC J. ; SIKORSKA M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. **Exp. Cell. Res.**, v. 213, p. 100-106, 1994.

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

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

WHATHES, D. C.; WOODING, F. B. P. An electron microscopic study of implantation in the cow. **American Journal of Anatomy**, v. 159, p. 285-306, 1981.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheather histologia funcional: Texto e atlas em cores**, 4. ed. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 409 p.

XUE, W. C.; FENG, H. C.; CHAN, K. Y. K.; CHIU, P. M.; NGAN, H. Y. S.; KHOO, U. S.; TSAO, S. W.; CHAN, K. W.; CHEUNG, A. N. Y. Id helix-loop-helix proteins are differentially expressed in gestational trophoblastic disease. **Histopathology**, v. 47, p. 303-309, 2005.

WINSATT, W. A. Observations on the morphogenesis cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, v.159, n.2, p. 209-243, 1980.

WOOD, G. A.; S. R.SARMA, D.; ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of glutathione S-transferase 7-7 positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1169-1175, 1999.

WOODING, F. B. P. Electron microscopic localization of binucleate cells in the sheep placenta using phosphotungstic acid. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 357-365, 1980.

WOODING, F. B.P . Localization of ovine placental lactogen in sheep placentomes by electron microscope immunocytochemistry. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 15-19, 1981.

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

WOODING, F. B. P. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 31-39, 1982. Suppl.

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

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R.B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, v. 17, p. 75-86, 1996.

WYLLIE, A.H.; KERR, A.H.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

XIANG, J.; CHAO, D. T.; KORSMEYER, S.J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 14559-14563, Dec. 1996.

ZOU, H.; HENZEL, W. J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 405-413, Aug. 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 - GRUPOS POR PERÍODOS DE GESTAÇÃO

Caso Nº	Meses gestacionais
1º grupo de 2 a 4,5 meses	
87Fri	2 - 3
84Fri	3
34Cajati	4
17Cajati	4
15Pietro	4
9S	3.8
6S	4.1
4S	4.1
2S	4.41
572BE	4.5
463BE	4.5
38Cajati	4.5
8S	4.5
003VPRA	4 - 5
1S	4.5
2º grupo de 5 a 6,5 meses	
553BE	6
512BE	5.5
442BE	5
436BE	6
369BE	6
85Fri	6
72Pira	5
68 Pira	5
28Cajati	6
24Cajati	6
006Cur	5 - 6
36SJC	6.5
6Cajati	6.5
3º grupo de 7 a 8,5 meses	
P100	7.7
237BE	8
79Fri	7 - 8
66BA	7.5
63BA	8
60BA	8.3
77Fri	8.5
4º grupo de 9 a 10 meses	
B2C	9
541Cur	10
86Fri	9 - 10
62BA	9.3
29SJC	9 - 10
008Aguai	10
005Aguai	10

ANEXO 2 - ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA (ESCORES) DA EXPRESSÃO DE CASPASE 3 CLIVADA EM PLACENTA DE BÚFALA

Caso Nº	Meses gestacionais	Deteção de Caspase 3 clivada
Escore para o grupo de 2 a 4,5 meses		
87Fri	2 - 3	2 #
84Fri	3	2
34Cajati	4	2
17Cajati	4	2
15Pietro	4	2
9S	3.8	2
6S	4.1	1
4S	4.1	1
2S	4.41	2
572BE	4.5	2
463BE	4.5	2
38Cajati	4.5	2
8S	4.5	1
003VPRA	4 - 5	2
1S	4.5	2
Escore para o grupo de 5 a 6,5 meses		
553BE	6	2
512BE	5.5	2
442BE	5	2
436BE	6	2
369BE	6	2
85Fri	6	2
72Pira	5	1
68 Pira	5	2
28Cajati	6	2
24Cajati	6	2
006Cur	5 - 6	2
36SJC	6.5	2
6Cajati	6.5	2
Escore para o grupo de 7 a 8,5 meses		
P100	7.7	2
237BE	8	2
79Fri	7 - 8	2
66BA	7.5	1
63BA	8	2
60BA	8.3	1
77Fri	8.5	2
Escore para o grupo de 9 a 10 meses		
B2C	9	2
541Cur	10	2
86Fri	9 - 10	3
62BA	9.3	1
29SJC	9 - 10	3
008Aguai	10	3
005Aguai	10	3

ANEXO 3 - ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA (ESCORES) DA EXPRESSÃO DE M 30 EM PLACENTA DE BÚFALA

Caso Nº	Meses gestacionais	Deteccção de M 30
Escores para o grupo de 2 a 4,5 meses		
87Fri	2 - 3	2 #
84Fri	3	1
34Cajati	4	2
17Cajati	4	2
15Pietro	4	2
9S	3.8	1
6S	4.1	1
4S	4.1	1
2S	4.41	2
572BE	4.5	1
463BE	4.5	1
38Cajati	4.5	2
8S	4.5	1
003VPRA	4 - 5	1
1S	4.5	2
Escores para o grupo de 5 a 6,5 meses		
553BE	6	1
512BE	5.5	2
442BE	5	1
436BE	6	2
369BE	6	1
85Fri	6	2
72Pira	5	1
68 Pira	5	2
28Cajati	6	2
24Cajati	6	3
006Cur	5 - 6	1
36SJC	6.5	2
6Cajati	6.5	2
Escores para o grupo de 7 a 8,5 meses		
P100	7.7	1
237BE	8	2
79Fri	7 - 8	2
66BA	7.5	1
63BA	8	2
60BA	8.3	1
77Fri	8.5	2
Escores para o grupo de 9 a 10 meses		
B2C	9	2
541Cur	10	2
86Fri	9 - 10	2
62BA	9.3	1
29SJC	9 - 10	3
008Aguai	10	3
005Aguai	10	3

ANEXO 4 - ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA (ESCORES) DA EXPRESSÃO DE PCNA EM PLACENTA DE BÚFALO.

Caso Nº	Meses gestacionais	Detecção de PCNA
Escore para o grupo de 2 a 4,5 meses		
87Fri	2 - 3	3 #
84Fri	3	3
34Cajati	4	3
17Cajati	4	2
15Pietro	4	3
9S	3.8	2
6S	4.1	2
4S	4.1	2
2S	4.41	2
572BE	4.5	2
463BE	4.5	2
38Cajati	4.5	3
8S	4.5	3
003VPRA	4 - 5	2
1S	4.5	2
Escore para o grupo de 5 a 6,5 meses		
553BE	6	2
512BE	5.5	2
442BE	5	3
436BE	6	2
369BE	6	1
85Fri	6	3
72Pira	5	3
68 Pira	5	2
28Cajati	6	3
24Cajati	6	3
006Cur	5 - 6	2
36SJC	6.5	1
6Cajati	6.5	3
Escore para o grupo de 7 a 8,5 meses		
P100	7.7	2
237BE	8	1
79Fri	7 - 8	1
66BA	7.5	1
63BA	8	2
60BA	8.3	1
77Fri	8.5	1
Escore para o grupo de 9 a 10 meses		
B2C	9	2
541Cur	10	1
86Fri	9 - 10	1
62BA	9.3	2
29SJC	9 - 10	1
008Aguai	10	2
005Aguai	10	2

ANEXO 5 - RELAÇÃO ENTRE GRAUS DE INTENSIDADE E ESCORES NOS DIVERSOS PERÍODOS GESTACIONAIS

intens//	meses gest	M 30	M 30	Caspase 3	Caspase 3	PCNA	PCNA
P100	7.7	1	(+)	2	(++)	2	(++)
B2C	9	2	(++)	2	(++)	2	(++)
572BE	4.5	2	(++)	2	(++)	3	(+++)
553BE	6	2	(++)	3	(+++)	2	(++)
541Cur	10	3	(+++)	2	(++)	2	(++)
512BE	5.5	3	(+++)	3	(+++)	3	(+++)
463BE	4.5	2	(++)	2	(++)	3	(+++)
442BE	5	2	(++)	3	(+++)	3	(+++)
436BE	6	3	(+++)	4	(++++)	2	(++)
369BE	6	1	(+)	2	(++)	1	(+)
237BE	8	3	(+++)	3	(+++)	2	(++)
87Fri	2 - 3	2	(++)	2	(++)	3	(+++)
86Fri	9 - 10	3	(+++)	3	(+++)	1	(+)
85Fri	6	3	(+++)	3	(+++)	3	(+++)
84Fri	3	2	(++)	3	(+++)	3	(+++)
79Fri	7 - 8	3	(+++)	3	(+++)	1	(+)
77Fri	8.7	2	(++)	3	(+++)	1	(+)
72Pira	5	1	(+)	2	(++)	3	(+++)
68 Pira	5	3	(+++)	3	(+++)	2	(++)
66BA	7.5	1	(+)	1	(+)	2	(++)
63BA	8	2	(++)	2	(++)	2	(++)
62BA	9.3	1	(+)	1	(+)	2	(++)
60BA	8.3	1	(+)	2	(++)	2	(++)
38Cajati	4.5	3	(+++)	3	(+++)	3	(+++)
36SJC	6.5	3	(+++)	2	(++)	1	(+)
34Cajati	4	3	(+++)	3	(+++)	3	(+++)
29SJC	9 - 10	3	(+++)	2	(++)	1	(+)
28Cajati	6	3	(+++)	2	(++)	3	(+++)
17Cajati	4	3	(+++)	3	(+++)	3	(+++)
15Pietro	4	3	(+++)	3	(+++)	4	(++++)
9S	3.8	2	(++)	3	(+++)	2	(++)
8S	4.5	2	(++)	1	(+)	3	(+++)
24Cajati	6	3	(+++)	2	(++)	3	(+++)
008Aguai	10	3	(+++)	2	(++)	3	(+++)
6S	4.1	2	(++)	2	(++)	2	(++)
006Cur	5 - 6	1	(+)	3	(+++)	3	(+++)
6Cajati	6.5	2	(++)	2	(++)	3	(+++)
005Aguai	10	3	(+++)	2	(++)	3	(+++)
4S	4.1	1	(+)	1	(+)	2	(++)
003VPRA	4 - 5	2	(++)	3	(+++)	2	(++)
2S	4.41	3	(+++)	3	(+++)	2	(++)
1S	4.56	2	(++)	2	(++)	2	(++)