GABRIELA APARECIDA JORGE DAOLIO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO SINCICIAL NO LABIRINTO DE PLACENTAS DE CAMUNDONGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

GABRIELA APARECIDA JORGE DAOLIO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO SINCICIAL NO LABIRINTO DE PLACENTAS DE CAMUNDONGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

GABRIELA APARECIDA JORGE DAOLIO

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO SINCICIAL NO LABIRINTO DE PLACENTAS DE CAMUNDONGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Estela Bevilacqua

Versão original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Jorge Daolio, Gabriela Aparecida
Caracterização do processo de diferenciação sincicial no labirinto de placentas de camundongo / Gabriela Aparecida Jorge Daolio; orientador Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua. -- São Paulo, 2018.
102 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Caspase-8. 2. Barreira placentária. 3. Labirinto. 4. Sinciciotrofoblasto. 5. Placenta. I. Andrade Forell Bevilacqua, Estela Maris , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela Aparecida Jorge Daolio

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização do processo de diferenciação sincicial no labirinto de placentas de camundongo

Orientador: Profa. Dra. Estela Bevilacqua

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Caracterização do processo de diferenciação das células sinciciais do labirinto de placentas de camundongo***", registrado sob o protocolo nº ***104/2015***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **5/10/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua**
- Membros da Equipe: *Aline Lorenzon-Ojea (Pós-Doutorando), Elaine Cardoso (Pós-Doutorando), Gabriela Aparecida Jorge Daolio (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Characterization of labyrinth syncytiotrophoblast differentiation in mouse placentas***", protocol nº ***104/2015***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/5/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua**
- Team members: Aline Lorenzon-Ojea (post-doctoral), Elaine Cardoso (post-doctoral), Gabriela Aparecida Jorge Daolio (Graduate student)

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	CD1	Fêmea/Female	5 meses/months	84

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha família, o alicerce de minha formação e o pilar de meus valores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Afonso Daolio e Ana Lucia Jorge Daolio, pelo suporte durante todo o tempo, pela paciência, pelos conselhos e por todos os ensinamentos. Sem vocês nada disso teria sido feito. Amo muito vocês!

À minha avó, meu amor maior, Zélia Carli Jorge.

À minha orientadora Profa. Dra. Estela Bevilacqua, por ter me recebido em seu laboratório, dedicando seu tempo a me repassar seu vasto conhecimento. Exemplo de pessoa e de profissional, a senhora me ensinou a beleza de toda a origem de nossa vida e que pequenos detalhes são fundamentais para seu sucesso. Muito obrigada por ter acreditado em mim e por me guiar na conquista deste sonho.

À minha família, em especial, meu tios e tias, primos e primas, e minhas maiores alegrias, Fernanda e Lorenzo, por estarem sempre presentes, torcendo e compartilhando das minhas conquistas e preocupações.

Aos meus anjos da guarda, Dra. Aline Lorenzon, Dra. Elaine Cardoso, Dra. Sara Gomes, que sempre me auxiliaram em tudo e são exemplos de profissionais e de pessoas. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por todos os conselhos, por todos os abraços. Levo vocês com muito carinho, sempre.

Às minhas amigas queridas Caroline Borgato Guedes, Jusciele Moreli, Simone Correa e Carla Bandeira, por terem partilhado tantos momentos especiais e por estarem sempre ao meu lado quando precisei. Assim como as Pós-Doutorandas, vocês tem um lugar muito especial comigo.

Aos meus colegas de laboratório Karen Matias, Karla Castro, Rodrigo Barbano e aos estagiários Franciele e Rafael, por toda a ajuda, esforço e por estarem presentes na partilha das dificuldades e alegrias do dia a dia.

Ao Prof. Sérgio Oliveira por todo o carinho, auxílio e conhecimento repassado nesses anos de convívio.

À Rosangela Augusto Farias e Marco Amadeu, por seus suportes emocionais e técnicos, além da dedicação por vocês proporcionada ao laboratório.

Aos funcionários Gaspar, Gisela, Cláudio, Brás e Fernando, pela imensa ajuda e paciência no cuidado com as amostras biológicas e os próprios animais utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Xavier Neto pela doação dos anticorpos utilizados no trabalho.

Aos meus amigos queridos que me acompanham desde os tempos da faculdade: Stefanni Rico, Natália Vale, Roberta Selingardi e Christian Sávio

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, por todo o auxílio, trabalho e dedicação em pró aos alunos.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, sempre solícitos e dispostos a ajudar no que for preciso.

À CNPq, pelo apoio financeiro durante os anos de 2015 a 2017 com o processo Nº 830595/1999-6.

À todos que estiveram diretamente, ou indiretamente, envolvidos e não foram citados, mas que se importaram e influenciaram esse projeto.

“And you can say what is, or fight for it
Close your mind or take a risk
You can say it's mine and clench your fist
Or see each sunrise as a gift”
(*Coldplay*)

RESUMO

DAOLIO, G A J. Caracterização do processo de diferenciação sincicial no labirinto de placentas de camundongo. 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A barreira placentária é constituída por duas camadas de células sinciciais, uma camada de células trofoblásticas gigantes e o endotélio fetal. Apesar da importância das camadas sinciciais no transporte molecular entre mãe e feto, o exato mecanismo de formação dessa barreira não está completamente elucidado em camundongos. Em humanos, estudos sugerem que a formação do sinciciotrofoblasto ocorre por um processo de fusão celular dependente de Caspase-8, uma proteína iniciadora da cascata de apoptose. Desta forma, este estudo teve como proposta analisar o processo de formação das camadas sinciciais do labirinto em placentas de camundongos e o possível envolvimento da caspase-8 neste processo. Sítios de implantação foram coletados de camundongos fêmeas nos dias 8,5 a 11,5 de gestação e caracterizados morfologicamente através de marcadores de células precursoras sinciciais (EpCAM) e de células sinciciais maduras (Slc16A3) por meio de reações imunohitoquímicas. A expressão gênica dos marcadores diferenciais de células sinciciais também foi analisada por RT-PCR na região labiríntica dissecada nos diferentes dias de gestação. A expressão de Caspase-8 total e clivada também foi avaliada por *Western blot* e a relação entre a presença de Caspase-8 clivada e a indução de apoptose, avaliada por TUNEL e pela imunolocalização da Citoqueratina 18 clivada. Tambem foram realizadas análises com células labirínticas cultivadas, isoladas nos dias 8,5 a 10,5 de gestação. As células cultivadas foram caracterizadas morfologicamente e avaliadas quanto a expressão gênica de marcadores sinciciais e proteica de Caspase-8. Nossos resultados mostraram que os primeiros sinais morfológicos de formação da barreira placentária ocorream no dia 9,5 de gestação. O marcador EpCAM foi encontrado na base da placenta nos dias 8,5 e 9,5. No dia 11,5 de gestação, o labirinto já se encontra estruturado e funcional, o que foi indicado pela expressão de Slc16A3, nos dias 10,5 e 11,5 de gestação. A expressão gênica dos fatores de transcrição associados ao desenvolvimento das camadas sinciciais mostraram expressões crescentes ao longo do período estudado. Caspase-8 total e clivada mostrou intensa expressão no dia 9,5 de gestação, e aparentemente não estava associada à morte celular por apoptose, uma vez que não se detectou reatividade pela reação de TUNEL ou imunomarcação de Citoqueratina 18 clivada nas células labirínticas em formação em nenhum dos dias estudados. Células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação e cultivadas formaram ninhos celulares ao longo das 48 horas de cultura, com indícios morfológicos de sincicialização. A imunolocalização do marcador de células progenitoras do labirinto, EpCAM foi mais intensa nas culturas de 6 horas e se limitou a áreas ao redor dos ninhos celulares após 48 horas. Inversamente, a imunolocalização do transportador sincicial Slc16A3 não foi observada após 6 horas de cultura, mas foi bastante intensa no centro dos ninhos celulares após 48 horas. As culturas de labirinto de 9,5 das de gestação, também mostraram aumento de expressão das Sincitinas A e B ao longo do tempo de cultivo. A análise da expressão proteica de Caspase-8 mostrou expressão mais alta após 6 horas de cultivo do que a observada nos demais tempos experimentais. Por outro

lado, a forma ativa (clivada) da caspase aumentou gradativamente após 24 e 48 horas de cultivo. Culturas submetidas ao tratamento com o inibidor farmacológico de Caspase-8 – z-IEDT-fmk, mostraram perfis morfológicos alterados com redução da formação dos ninhos celulares e diminuição da reatividade ao Slc16A3. A expressão dos marcadores de diferenciação Sincitina A e B também foi significativamente diminuída ($p<0.05$) nestes experimentos em que a inibição da Caspase-8 clivada foi comprovada por *Western blot*. Estes achados mostraram a expressão de Caspase-8, principalmente no dia 9,5 de gestação, nas células trofoblásticas labirínticas da placenta de camundongos e sugerem sua participação na formação das camadas sinciciais do labirinto.

PALAVRAS-CHAVE: Caspase-8. Barreira placentária. Labirinto. Sinciciotrofoblasto. Placenta.

ABSTRACT

DAOLIO, G A J. Characterization of the sincicial differentiation process of labyrinth in mice placenta. 2017. 102 p. Masters thesis (Departament of Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Two layers of syncytial cells, a layer of trophoblastic giant cells and the fetal endothelium form the placental barrier. Despite the importance of the syncytial layers in molecular transport between mother and fetus, its exact developmental mechanism is still not completely elucidated in rodents. In humans, studies suggest that the formation of the syncytiotrophoblast occurs through a cell fusion process dependent on Caspase-8, an apoptosis cascade-initiating protein. In this way, this study had the proposal to analyze the process of formation of the syncytial layers of the labyrinth in placentas of mice and the possible involvement of Caspase-8 in this process. Implantation sites were collected from female mice on days 8.5 to 11.5 of gestation and morphologically characterized by the labyrinthine precursor cell marker – EpCAM, and the mature syncytial cell marker - Slc16A3, through immunohistochemical reactions. The gene expression of the differential markers of syncytial cells was analyzed by RT-PCR in the labyrinthine region dissected on the different days of gestation. Total and cleaved Caspase-8 expression was also evaluated by Western blot and the relationship between the presence of cleaved Caspase-8 and the induction of apoptosis as assessed by TUNEL and the immunolocalization of the cleaved Cytokeratin 18. Analyzes were also performed with cultured labyrinth cells, isolated on days 8.5 to 10.5 of gestation. The cultured cells were characterized morphologically and evaluated for the gene expression of syncytial markers and Caspase-8 protein. Our results showed that the first morphological signs of placental barrier formation occurred on day 9.5 of gestation. The EpCAM marker was found at the base of the placenta on days 8.5 and 9.5. At day 11.5 of gestation, the labyrinth is already structured and functional, which was indicated by the expression of Slc16A3, on days 10.5 and 11.5 of gestation. The gene expression of the transcription factors associated with the development of the syncytial layers showed increased throughout the studied period. Total and cleaved Caspase-8 showed intense expression at day 9.5 of gestation, and apparently was not associated with cell death by apoptosis, since no reactivity was detected by the TUNEL reaction or cleaved Cytokeratin 18 immunolabeling in the labyrinthine zone. Labyrinthine cells obtained at 9.5 days of gestation formed nests during the 48 hours of culture, with morphological signs of syncytialization. Immunolocalization of the progenitor cell marker EpCAM was more intense in the 6-hour cultures and was limited to areas around the cell nests after 48 hours. Conversely, immunolocalization of the syncytial transporter Slc16A3 was not observed after 6 hours of culture but was quite intense at the center of the cell nests after 48 hours. Labyrinthine cell cultures of 9.5 gestation days also showed increased expression of A and B syncytins throughout the culture time. Analysis of the protein expression of Caspase-8 showed higher expression after 6 hours of culture than that observed in the other experimental times. On the other hand, the active (cleaved) form of Caspase gradually increased after 24 and 48 hours of culture. Cultures submitted to the pharmacological inhibitor of Caspase-8 - z-IEDT-fmk showed altered morphological

profiles with reduction of cell nests formation and a decrease of reactivity to Slc16A3. The expression of the differentiation markers A and B Syncytins was also significantly decreased ($p < 0.05$) in the experiments, in which the inhibition of the cleaved Caspase-8 was confirmed by Western blot. These findings show the expression of Caspase-8, mainly on day 9.5 of gestation, in the labyrinthine cells of the mice placenta and suggest its participation in the formation of the labyrinthine syncytial layers.

Keywords: Caspase-8. Placental barrier. Labyrinth. Syncytiotrophoblast. Placenta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da diferenciação celular sofrida pelas células trofoblásticas polares e abembrionárias após a implantação.....24

Figura 2. Desenvolvimento do cone ectoplacentário (EPC), dias 6,5 (A,D), 7 (B,E) e 7,5 (C,F) de gestação.....30

Figura 3. Representação do processo de fusão cório-alantoideana dependente da interação de fatores presentes nos mesodermas alantoideano e coriônico.....32

Figura 4. Representação da barreira placentária em camundongos.....35

Figura 5. Representação esquemática da placenta de camundongos madura detalhando a localização das diferentes populações de células trofoblásticas gigantes e a vascularização da placenta.....36

Figura 6. Comparação morfológica entre as placentas de camundongos e humanos.....38

Figura 7. Esquema representativo da fusão de células citotrofoblásticas dependente de caspase 8 no vilo trofoblástico humano.....41

Figura 8. Sítios de implantação, dia 8,5 de gestação.....47

Figura 9. Sítio de implantação aos 9,5 dias de gestação.....59

Figura 10. Esquema ilustrando o isolamento da porção labiríntica de placentas de dia 9,5 de gestação.....60

Figura 11. Sítios de implantação, dia 10,5 de gestação.....61

Figura 12. Expressão gênica dos fatores *Dlx3 e Gcm1 e, Sincitina A e B* na região pré-labiríntica e labiríntica da placenta de camundongos de 8,5 a 10,5 dias de gestação.....62

Figura 13. Expressão de caspase-8 durante o desenvolvimento do labirinto. Análise por *Western blotting* 63

Figura 14. Imunolocalização de citoqueratina 18 clivada e reação de TUNEL para a identificação de células em apoptose.....64

Figura 15. Cultura de células obtidas da região labiríntica aos 9,5 dias de gestação.....66

Figura 16. Caracterização das culturas de células placentárias obtidas no dia 9,5 de gestação.....67

Figura 17. Imunolocalização de marcadores trofoblásticos em células cultivadas, obtidas no dia 9,5 de gestação.....68

Figura 18. Expressão gênica de marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas obtidas em diferentes dias gestacionais.....69

Figura 19. Expressão de caspase-8 em células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação e cultivadas por 24 e 48 horas após o tratamento com z-IETD-fmk.....70

Figura 20. Imunolocalização de marcadores de diferenciação em células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação tratadas com z-IETD-fmk.....71

Figura 21. Expressão gênica dos marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de anticorpos utilizados nesse estudo.....50

Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos e suas sequências utilizados na técnica de RT-PCR.....54

Tabela 3 – Lista dos anticorpos e suas respectivas diluições utilizados (*Western Blotting*) 55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

CD31 – Cluster de diferenciação 31

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CK – Citoqueratina

CO_2 - Dióxido de carbono

DAB - Diaminobenzidina

DEPC – Dietil pirocarbonato

D-MEM – *Dulbecco modification of Minimum Essential Media*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase - *Deoxyribonuclease*

DNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

IgG – Imunoglobulina G

Lu/BCAM – *Basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)*

M – Molar

NaCl – Cloreto de sódio

PBS – Tampão fosfato salina

RIPA – *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

Rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

SBF – Soro bovino fetal

TBS - *Tris-hydroxymethilaminomethane-buffered saline*

U – Unidade

V – Volts

V/V – Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 Formação da placenta em camundongos 22
2.2 Implantação 23
2.3 Desenvolvimento inicial da placenta de camundongos 24
2.4 Estrutura da placenta madura de camundongos 26
Decídua 26
Espongiotrofoblasto 28
Labirinto 29
2.5 Placentação 30
2.6 Fusão cório-alantoideana 31
2.6.1 Morfogênese do labirinto 32
2.7 Vascularização placentária 35
2.8 Formação do sinciciotrofoblasto em humanos 37
2.8.1 Caspases e sua participação na formação do sinciciotrofoblasto 39
3 OBJETIVOS 43
3.1 Objetivo Geral 44
3.2 Objetivos específicos 44
4 MATERIAIS E MÉTODOS 45
4.1 Animais 46
4.2 Coleta das amostras 46
4.3 Isolamento e cultivo de células labirínticas nos dias 8,5, 9,5 e 10,5 47
4.4 Análise morfológica dos sítios de implantação 48
4.5 Caracterização das células cultivadas 49
4.6 Imunolocalização de marcadores de diferenciação 49
4.7 Análise da morte celular por apoptose 50
4.8 Análise da expressão gênica para caracterização do processo de diferenciação labiríntica 51
4.8.1 Extração de RNA 51
4.8.2 Geração de cDNA 52
4.8.3 Ensaio por PCR em Tempo Real 52
4.8.3.1 Primers 52
4.8.3.2 Reação de RT-PCR 53

4.9 Análise proteica dos marcadores de diferenciação das células labirínticas (*Western blotting*) 54
4.10 Inibindo a caspase-8 55
4.11 Análise Estatística 55
5 RESULTADOS 57
5.1 Imunolocalização de marcadores de células progenitoras e sinciciais labirínticas durante o desenvolvimento placentário 58
5.2 Expressão gênica dos marcadores de diferenciação sincicial 61
5.3 Expressão de Caspase-8 durante o período de diferenciação labiríntica 63
5.4 Morte celular programada por apoptose na região de morfogênese 64
5.5 Caracterização morfológica das culturas de células labirínticas 65
5.6 Expressão gênica de marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas 68
5.7 Bloqueio da clivagem de Caspase-8 com o inibidor z-IEDT-fmk nas células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação 69
5.8 Caracterização morfológica das culturas de células labirínticas obtidas no dia 9,5 de gestação tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk 70
5.9 Perfil de expressão gênica dos marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk 71
6 DISCUSSÃO 73
7 CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão transitório característico da gestação. Essa estrutura é formada por diferentes tipos celulares que, em associação, permitem e fornecem condições para um perfeito equilíbrio funcional entre os organismos materno e fetal. A estrutura chave para as trocas materno-fetais na placenta de camundongo é uma região denominada de labirinto. Esta região é a mais vascularizada da placenta e é formada pela barreira placentária ou membrana interhemal (JOLLIE, 1963; HERNANDEZ-VERDUN, 1974; SIMMONS et al., 2008). Esta unidade contém uma camada (camada I) de células trofoblásticas gigantes sinusoidais (CTG-s) que entram em contato com o sangue materno e, duas camadas sinciciais (camada II e III) em contato com os capilares fetais. Essa camada de células fusionadas é responsável pelo transporte de nutrientes que pode ocorrer nos dois sentidos: organismo materno para organismo fetal e vice-versa. Este transporte utiliza diferentes mecanismos, incluindo proteínas transportadoras de membrana (HERNANDEZ-VERDUN, 1974; revisto por BURTON; FOWDEN, 2012).

Muito do que se sabe atualmente sobre a formação da placenta e, desta região placentária, deve-se especialmente aos animais *knockout*, que tendo a expressão de certos genes neutralizada, permitiu compreender mecanismos essenciais como a fusão cório-alantoideana (WATSON; CROSS, 2005) e a diferenciação do sinciciotrofoblasto (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000; SCHREIBER et al., 2000). Estes *knockouts* também foram de extrema importância para a descoberta de fatores de transcrição, como o *Gcm1* (do inglês, *Glial cell missing homolog 1,*BASYUK et al., 1999), dos marcadores exclusivos de trofoblasto, como o *Tpbpα* (do inglês *Trophoblast specific protein alpha*, SCOTT et al., 2000), das vias de diferenciação das células trofoblásticas gigantes (SIMMONS et al., 2007), do papel das sincitinas na formação da camada de sinciciotrofoblasto (DUPRESSOIR et al., 2005) e, mais recentemente, na caracterização de populações de células tronco placentárias (UENO et al., 2013; NATALE et al., 2017). No entanto, muitos detalhes moleculares desses processos ainda são pouco conhecidos devido a sua extrema complexidade.

Na placenta humana, a região de trocas que corresponde ao labirinto em camundongos é denominada de região vilosa por conter vilosidades coriônicas. Estas estruturas são revestidas por sinciciotrofoblasto e repousam sobre células individualizadas, as células citotrofoblásticas vilosas. Proliferação e mecanismos de fusão entre estas células são responsáveis por gerar a camada sincicial e

consequentemente dar origem ao sinciciotrofoblasto (ENDERS, 1965; BURTON et al., 2003).

Estudos de Huppertz e seus colaboradores no final da década de 90, mostraram evidências, nas quais o processo de fusão das células citotrofoblásticas estaria associado à ativação da Caspase-8, em um mecanismo semelhante ao desencadeamento de apoptose (HUPPERTZ et al., 1999). Em linhas gerais, os autores sugeriram que os estágios iniciais da apoptose estavam relacionados à interrupção do ciclo celular levando à clivagem de proteínas do citoesqueleto. Como consequência, haveria desestruturação da membrana plasmática e ativação de um processo de diferenciação celular que, permitindo maior interação entre células vizinhas, culminaria com a sincicialização do trofoblasto e incorporação de novas células à camada sincicial já formada. Também foi mostrado o papel das proteínas Sincitinas A/B e seus receptores - proteínas do envelope de retrovírus incorporados ao genoma humano – no potencial de fusionamento destas células (HUPPERTZ et al., 2006).

Neste estudo, buscou-se investigar a possível participação da Caspase-8 no processo de formação do sinciciotrofoblasto labiríntico, ampliando dessa forma o conhecimento sobre a formação da placenta em camundongos. Ressalta-se que a barreira placentária nesta espécie tem sido exaustivamente estudada como modelo para estudos de intercorrências da gravidez, tornando desta forma, o esclarecimento de seus mecanismos morfogenéticos de extrema relevância.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Formação da placenta em camundongos

A placenta é um órgão transitório presente em mamíferos, sendo responsável pela manutenção da gestação, na medida em que desempenha funções essenciais para a adaptação do organismo materno e sobrevivência fetal em muitos de seus aspectos.

O desenvolvimento placentário é um processo complexo. Alterações diretas ou indiretas das vias de sinalização que atuam em suas funções ou desenvolvimento podem causar intercorrências gestacionais associadas a desvios morfológicos, anatômicos, funcionais ou até mesmo à morte fetal e materna (ROSSANT; CROSS, 2001).

Esse órgão, cuja função primordial é mediar trocas de substâncias e oxigênio entre os organismos materno e fetal e, ainda, produzir hormônios imprescindíveis para a gestação, é constituído principalmente por células epiteliais diferenciadas, chamadas trofoblásticas. Em sua forma madura, a placenta é formada pelas regiões: placa coriônica, localizada na região basal em contato com o âmnio, labirinto, maior região da placenta, ocupando uma posição intermediária, zona juncional, constituída pelo espongiotrofoblasto, células de glicogênio e células trofoblásticas gigantes parietais e, decídua, o constituinte materno da placenta. É na região do labirinto que ocorrem as trocas moleculares entre o sangue materno e fetal através da barreira placentária. A barreira, por sua vez, é constituída por duas camadas de sinciciotrofoblasto e uma camada de células trofoblásticas gigantes sinusoidais, além das células endoteliais dos vasos sanguíneos fetais. Sinciciotrofoblasto em contato com o sangue materno também é encontrado em placentas humanas, caracterizando a classificação dessas placentas em hemocoriais (HERNANDEZ-VERDUN, 1974; WATSON; CROSS, 2005).

Apesar de diferenças na estrutura e na fisiologia entre as placentas humana e de camundongo, o modelo murino ainda é muito utilizado no estudo de intercorrências gestacionais humanas, na medida em que expressa marcadores de superfície e vias de sinalização semelhantes, além da facilidade de manipulação gênica nesta espécie.

2.2 Implantação

Em camundongos, por volta do dia 3,5 de gestação, o embrião atinge o estágio de blastocisto, que se caracteriza por apresentar duas populações celulares distintas: as células periféricas denominadas de trofoectoderma, que revestem o blastocisto e formarão a placenta e, as células da massa celular interna (MCI ou embrioblasto), um aglomerado celular internalizado no blastocisto que formará o corpo do embrião. O blastocisto ainda contém uma cavidade - a blastocele.

A formação do blastocisto inicia-se precocemente com o processo de compactação da mórula. Nesta fase, os blastômeros se aproximam e se unem entre si por meio de proteínas de adesão e junções intercelulares. Durante esse processo, os blastômeros que permanecem em contato com a zona pelúcida, mais externamente, dão origem ao trofectoderma, enquanto que as células que ficam internalizadas dão origem à MCI (Figura 1A). Essas células expressam os fatores de transcrição *Oct4* (*Octamer-binding transcription factor 4*) e *Nanog* (*Nanog homeobox*) enquanto que as células do trofectoderma expressam o fator *Cdx2* (*Caudal type homeobox 2*, revisto por CROSS, 2000; SIMMONS; CROSS, 2005). Além disso, as células da MCI expressam o fator de crescimento fibroblástico *Fgf4* (*Fibroblast growth fator 4,* TANAKA et al., 1998) ao mesmo tempo em que o receptor para este fator de crescimento é expresso nas células do trofectoderma (*FgfR2 – Fibroblast growth factor receptor 2*). Evidências mostram que as vias de sinalização desencadeadas pela ligação Fgf4-FgfR2 nas células do trofectoderma participam do processo de diferenciação dos diversos tipos de células trofoblásticas (TANAKA et al., 1998; HAFFNER-KRAWSZ et al.,1999, revisto por SIMMONS; CROSS, 2005). A região que contém as células da MCI é conhecida como polo embrionário, enquanto que a região oposta recebe o nome de polo abembrionário (Figura 1). As células da MCI em contato com a cavidade blastocística dão origem ao endoderma primitivo, que formará o saco vitelínico visceral e parietal. As células embrioblásticas restantes em contato com o trofectoderma dão origem ao epiblasto, o qual formará o embrião propriamente dito (Figura 1B).

O processo de diferenciação do trofectoderma se inicia na região abembrionária, ao redor do dia 4,5 de gestação. Estas células sofrem um processo de endoreplicação (aumento da quantidade de DNA, sem divisão celular), aumentam suas proporções celulares e nucleares (ENDERS; SCHLAFKE, 1967; BEVILACQUA;

ABRAHAMSOHN, 1988, 1989) e são denominadas de células trofoblásticas gigantes primárias ou células trofoblásticas murais (**CTG-m,** HU; CROSS, 2010). Estas células estão relacionadas ao processo de implantação do blastocisto na região antimesometrial uterina. Essa população de células são as primeiras a adquirirem diferenciação completa durante a embriogênese. No polo embrionário, as células do trofectoderma polar em contato com as células do embrioblasto, proliferam e formam o ectoderma extra-embrionário (Figura 1C). As células do ectoderma extra-embrionário expressam os marcadores *Err2/Errβ* (*Estrogen-related receptor beta*), *Eomes* (*Eomesodermin*), *Cdx2* (SIMMONS; CROSS, 2005) em resposta ao Fgf4. Esses fatores são necessários para manter a proliferação dessas células (GUZMAN-AYALA et al., 2004), o que desloca as células do embrioblasto - que já se encontra diferenciado em epiblasto e endoderma primitivo - para o interior da blastocele. Esse evento morfogenético culmina com (Figura 1D): a) o revestimento externo do ectoderma extraembrionário e epiblasto pelas células do endoderma primitivo (também em expansão nesta fase); b) formação de uma cavidade entre as células trofoblásticas murais e o endoderma, formando o saco vitelínico; e c) formação de uma cavidade interna ao epiblasto contínuo com o ectoderma extraembrionário, a cavidade pró-amniótica (SNELL, 1966).

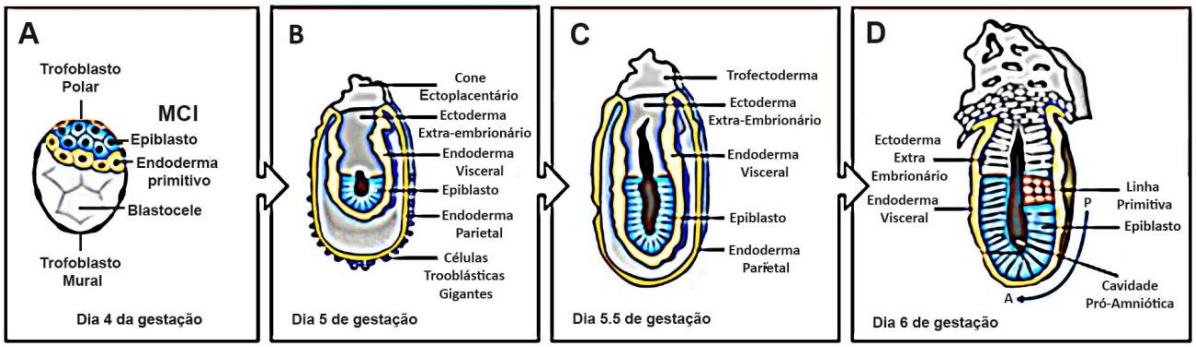

Figura 1. Esquema representativo da diferenciação celular sofrida pelas células trofoblásticas polares e abembrionárias após a implantação. As células do trofoectoderme mural dão origem às células trofoblásticas gigantes. As células trofoblásticas polares dão origem ao cone ectoplacentário e ao ectoderma extraembrionário, que ao proliferar desloca as células do epiblasto para o interior da blastocele. Este movimento faz com que o ectoderma extraembrionário e o epiblasto sejam revestidos pelas células do endoderma primitivo; a cavidade entre as células trofoblásticas murais e o endoderma, forma o saco vitelínico (dividido em parietal associado ao trofoblasto e, visceral associado ao epiblasto); a cavidade interna que se forma no epiblasto e ectoderma extraembrionário é a cavidade pró-amniótica. Modificado de http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f23.jpg.

2.3 Desenvolvimento inicial da placenta de camundongos

A contínua proliferação das células do trofoectoderme polar forma uma estrutura projetada para a região mesometrial – o cone ectoplacentário, que contém células centrais e periféricas (Figura 2). As células centrais possuem grande capacidade proliferativa, muitas com características de células-tronco, expressando os marcadores *Esrrβ, Errβ, Eomes* (HEMBERGER; CROSS, 2001; ROPER; HEMBERGER, 2009; BEVILACQUA et al., 2014), sendo conhecidas também como células trofoblásticas intermediárias (CROSS, 2000; ROPER; HEMBERGER, 2009; SENNER, 2012). Algumas destas células expressam também genes associados ao processo de diferenciação do cone ectoplacentário, tais como *Ascl2* (ou *Mash2*, *Achaete-scute complex-like 2*), *Hand1* (*Heart and neural crest derivatives expressed 1*) e *Tpbpα* (*Trophoblast specific protein alpha,* CARNEY et al.,1993; SCOTT et al., 2000).

As células periféricas, por sua vez, assim como as células gigantes primárias, tornam-se poliplóides, aumentam suas dimensões e foram inicialmente denominadas em conjunto de células trofoblásticas gigantes secundárias (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988, 1989; GONÇALVES et al., 2003; SIMMONS et al., 2007). Atualmente essa população trofoblástica tem sido também denominada de células gigantes trofoblásticas parietais (**CTG-p**). São derivadas de precursores presentes no cone ectoplacentário e no ectoderma extra-embrionário, o que foi demonstrado pela expressão de marcadores moleculares nestas duas populações celulares tais como os genes *Prl3d1* e *Prl4a1* (*Prolactin family 3 and 4, subfamily d and a, member 1,* CARNEY et al., 1993; TANAKA et al., 1998; MA; LINZER, 2000; HUGHES et al., 2004; SIMMONS et al., 2007, 2014).

Estas células possuem diferentes níveis de especialização, associadas a diferentes morfologias e marcadores moleculares (SIMMONS; CROSS, 2005; SIMMONS et al., 2007; HU; CROSS, 2010) e fazem a interação com os tecidos uterinos em todo o perímetro do cone ectoplacentário (Figura 2A). Elas não proliferam e possuem alta capacidade invasiva e fagocítica (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988, 1989; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004). Participam de importantes processos como a implantação do blastocisto na região mesometrial, interação com a decídua, secreção de hormônios e moléculas de regulação, imunorregulação, angiogênese e defesa do embrião (CROSS et al., 1994; SIMMONS et al., 2007; HU; CROSS, 2010).

As CTG secundárias que se encontram associadas aos sinusoides maternos são denominadas de células trofoblásticas gigantes parietais - **CTG-p** (SIMMONS et al., 2007) e possuem como marcador exclusivo a *Catepsina Q* (*Ctsq*, ISHIDA et al., 2004; SIMMONS et al., 2007).

Durante a fase de implantação embrionária e imediatamente após, as **CTG-p** da região mural e posteriormente também na região embrionária, invadem os vasos sinusoidais endometriais substituindo gradualmente suas células endoteliais (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988, 1989). Esta invasão vascular leva ao extravasamento de sangue na malha de **CTG-p** que envolve todo o embrião, estabelecendo a primeira superfície de trocas entre os organismos materno e embrionário. A interação das **CTG-p** com os vasos arteriais maternos é mais tardia e ocorre por meio das células trofoblásticas gigantes associadas a artérias abreviadas como **CTG-spa**.

2.4 Estrutura da placenta madura de camundongos

A placenta madura é composta por uma porção materna – a decídua mesometrial, e porção fetal, composta por três regiões distintas, a zona juncional, labirinto e placa coriônica. Sua composição celular e funções são discriminadas nos tópicos a seguir.

Decídua

A decídua tem importante papel na interface materno-fetal, constituindo a porção materna da placenta.

Após o período de implantação, por volta do dia 5 de gestação, ocorrem alterações morfológicas, moleculares e funcionais no endométrio, que em conjunto recebem o nome de reação decidual ou decidualização (revisto por RAMATHAL et al., 2010; FAVARO et al., 2014). Esse processo é importante para o estabelecimento de uma interface materno-fetal e formação de um ambiente permissivo ao crescimento fetal. É um processo altamente regulado e influenciado, principalmente por alterações nos níveis dos hormônios – estrógeno e progesterona – e de seus receptores (MA et al., 2003; RAMATHAL et al., 2010; DAIKOKU et al., 2011; FAVARO et al., 2014).

O processo de decidualização é caracterizado por alterações nas células estromais uterinas que proliferam e transdiferenciam, substituindo suas características conjuntivas por um perfil epitelial, incluindo formas celulares volumosas, justapostas e poliédricas, acúmulo de lipídeos e glicogênio, e produção de hormônios como a prolactina (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993; CROSS et al., 2002; FAVARO et al., 2014).

As primeiras células deciduais são observadas por volta do dia 5 de gestação, circundando a região do sítio de implantação, na porção antimesometrial uterina (SNELL, 1966; KATZ; ABRAHAMSOHN, 1987). A região mesometrial só começa a apresentar células deciduais por volta do dia 7 de gestação. Quando comparadas, as células deciduais das duas regiões uterinas possuem diferenças entre si. Enquanto as células deciduais da região antimesometrial possuem grande quantidade de junções intercelulares, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, as que povoam a região mesometrial apresentam tamanho menor, menos quantidade de organelas, sendo essas não tão bem desenvolvidas em relação às anteriores, e menos junções de adesão entre as células (FAVARO et al., 2014). A renovação dessa população é realizada por células pré-deciduais encontradas na periferia das regiões onde as células deciduais maduras se encontram (ZORN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1995, 1998; FAVARO et al., 2014).

Até o dia 9,5 de gestação, podemos encontrar proliferação e diferenciação das células deciduais mesometriais, alimentando a camada decidual e renovando-a. Após esse período, por meio de um processo de morte celular programada (apoptose), inicia-se a involução da decídua até o dia 13,5 de gestação (HIRABAYASHI et al., 1999; JOSWIG et al., 2003). Ainda na região mesometrial coexiste uma estrutura formada por tecido linfoide secundário, a glândula metrial, localizada no polo mais extremo da decídua abrigando células imunocompetentes, como uNKs (*uterine natural killers*), que estimulam a produção de fatores angiogênicos e vasodilatadores (revisto por CROY et al., 2002; CROY et al., 2010). Essas células se mostraram fundamentais no desenvolvimento placentário; em sua ausência, não ocorreram alterações nas dimensões e na estrutura da parede dos vasos arteriais uterinos, prejudicando o desenvolvimento da gestação (revisto por CROY et al., 2002; CROY et al., 2010).

A decidualização tem grande importância na adaptação do sistema vascular materno, estimulando a angiogênese e o aumento de permeabilidade dos vasos uterinos durante a gravidez. A artéria uterina materna, originária das artérias radiais maternas, é responsável por suprir a placenta com sangue materno (ADAMSON et al., 2002; CROSS et al., 2002). Ao entrar em contato com a decídua, ela é subdividida em várias artérias espiraladas, que alcançam a interface materno-fetal (decídua *basalis*) onde entram em contato com as CTG-p. Estas células substituem as camadas do vaso arterial (remodelação vascular) formando um canal trofoblástico único contendo o sangue arterial materno que atravessa a região fetal da placenta. Na região da placa coriônica, este canal se ramifica e em contato com os seios labirínticos, sob a forma de tortuosos sinusoides, permite que o sangue materno percorra esses espaços que fazem parte da barreira placentária (ADAMSON et al., 2002; CROSS et al., 2002; RAI; CROSS et al., 2014). O sangue materno alcança os espaços deixados por entre as células da zona juncional e é drenado pelos capilares endometriais, previamente abertos pelas células gigantes parietais.

Espongiotrofoblasto

Entre o labirinto e a camada de células gigantes do cone ectoplacentário, ao redor do dia 10,5 de gestação, forma-se o espongiotrofoblasto (SNELL, 1966). As células desta região não estão completamente caracterizadas, porém expressam *Tpbp*α (LESCISIN et al., 1988). Estas células produzem hormônios e fatores de remodelação tecidual e fornecem apoio estrutural ao desenvolvimento do labirinto (IWATSUKI et al., 2000; CROSS et al., 2002; WATSON; CROSS, 2005). No dia 12,5 de gestação, surgem células denominadas de glicogênio, também derivadas do cone ectoplacentário, entre as demais células do espongiotrofoblasto. Essa derivação foi comprovada pela expressão dos genes *Pcdh12* (*Protocadherin 12*) do dia 7,5 a 18,5 de gestação especificamente nas células de glicogênio (BOUILLOT et al., 2006), *Cx31 (Gjb3, Gap junction protein, beta 3*, PLUM et al., 2001; COAN et al., 2006), *Prlpn* (*Prl7b1*, *Prolactin family 7, subfamily b, member 1*), expresso também em CTG-spa e CTG-c (SIMMONS et al., 2008) e *Prdm1* (ou *Blimp1*; *PR domain containing 1*, MOULD et al., 2012) expresso nas células do cone ectoplacentário e de glicogênio.

As células de glicogênio apresentam morfologia própria e atividade migratória, atravessando a camada de células trofoblásticas gigantes parietais e invadindo a

decídua mesometrial (SIMMONS; CROSS, 2005). Na segunda metade da gestação do camundongo, são as principais fontes do fator de crescimento de fibroblasto 2 (Fgf2, REDLINE et al., 1993) e acredita-se que funcionem como um reservatório de energia (glicogênio) para o crescimento fetal (RAI; CROSS, 2014). Em estudo recente, uma linhagem de camundongo Blimp1/Prdm1^{+} (MOULD et al., 2012) mostrou que as células do cone ectoplacentário que expressam o gene *Prdm1* dão origem a populações de **CTG-spa**, **CTG-c** e células de glicogênio, sendo que essas últimas, apesar de expressarem *Prdm1*, não necessitam obrigatoriamente desse gene para se diferenciarem (MOULD et al., 2012). Ao contrário, o processo de diferenciação das **CTG-spa** tem se mostrado dependente de Prdm1 (SIMMONS et al., 2007; MOULD et al., 2012). Estudos envolvendo o rastreamento de linhagens tem sido de extrema importância para a caracterização das populações que constituem a placenta de camundongos.

Labirinto

O labirinto representa uma grande área da superfície placentária, característica por abrigar uma intrincada rede vascular envolvendo sinusoides maternos e vasos fetais, e por ser a área de trocas moleculares entre os organismos materno e fetal. Essa troca ocorre por meio da barreira placentária que é constituída por uma camada dupla de sinciciotrofoblasto, uma monocamada de células trofoblásticas gigantes e por células do endotélio fetal. As populações de células trofoblásticas são provenientes de diferentes progenitores (HERNANDEZ-VERDUN, 1974; ROSSANT; CROSS, 2001; WATSON; CROSS, 2004; DUPRESSOIR et al., 2005; SIMMONS et al., 2008; HENKE et al., 2013). As duas camadas de sinciciotrofoblasto são formadas por células fusionadas (sinciciotrofoblasto II e III). Elas, aparentemente, possuem origens diferentes, sendo a camada II proveniente da base do cone ectoplacentário, assim como as CTG-s (camada I), enquanto que a camada III é reconhecida por ter como progenitoras as células coriônicas (HERNANDEZ-VERDUN, 1974; WATSON; CROSS, 2004; HU; CROSS, 2010; SIMMONS, 2014). As células endoteliais fetais, por sua vez, são provenientes do mesoderma alantoideano. A formação do labirinto será mais detalhada adiante.

Na base do labirinto se encontra a placa coriônica, região diferenciada a partir da associação do ectoderma extraembrionário e do mesoderma extraembrionário e alantoideano. É nessa área que ocorre a fusão cório-alantoideana, principal evento

morfogenético que culmina na formação e desenvolvimento do labirinto (WATSON; CROSS, 2005) e, serve como ponto de ancoragem dos vasos sanguíneos fetais, provenientes do alantoide e cordão umbilical.

2.5 Placentação

Em camundongos, ao redor do 6° dia de gestação ocorre a gastrulação e a diferenciação e crescimento do folheto mesodérmico entre as células do epiblasto e do endoderma primitivo (Figura 2A-D). Ocorre também o crescimento do mesoderma para fora dos limites embrionário formando um mesoderma extraembrionário. A associação deste mesoderma com o ectoderma extraembrionário dá origem ao cório, enquanto que a associação desse mesoderma com o epiblasto dará origem ao âmnio (Figura 2B-E) (SNELL, 1966).

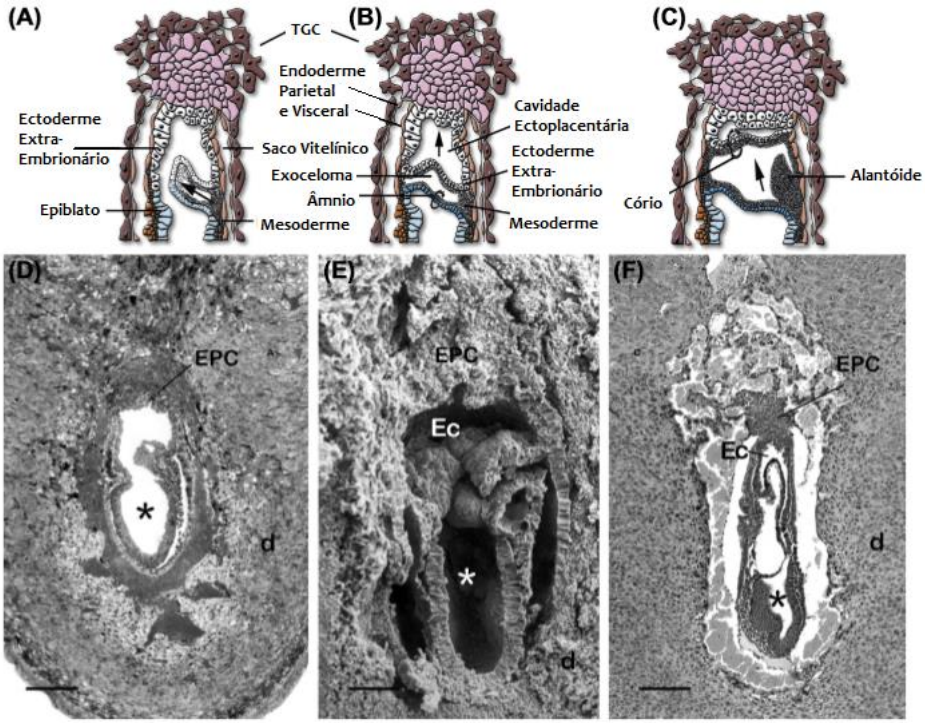

Figura 2.Desenvolvimento do cone ectoplacentário (EPC), dias 6,5 (A,D), 7 (B,E) e 7,5 (C,F) de gestação. Notar a formação das três cavidades (ectoplacentária [Ec], exocelômica e amniótica [*]) e o crescimento do mesoderma alantoideano (**C,F**). (d) decídua. (CTG) células trofoblásticas gigantes. **D**, **F**: HE; **E**: Microscopia eletrônica de varredura. Barra =250 μm (Modificado de Bevilacqua et al., 2014)

No dia 7,5 de gestação, o ectoderma extraembrionário invagina pela cavidade pró-amniótica e se fusiona com o lado oposto, dando origem a três cavidades distintas: a) a cavidade ectoplacentária (revestida por células do ectoderma

extraembrionário); b) o exoceloma (envolvido por células do cório e do âmnio); c) a cavidade amniótica (envolvida por células do âmnio e do ectoderma embrionário) (Figura 2B-E) (SNELL, 1966; BEVILACQUA et al., 2014). Concomitante à delimitação das três cavidades, o alantoide inicia seu desenvolvimento na própria cavidade exocelômica (Figura 2C–F). No dia 8 de gestação, a cavidade do cone ectoplacentário é obliterada, com a aproximação das células do cório e do cone ectoplacentário. O crescimento da porção mesodérmica do alantoide no exoceloma permite a aproximação e ligação deste mesoderma ao mesoderma coriônico, etapa conhecida como fusão cório alantoideana (WATSON; CROSS, 2005).

2.6 Fusão cório-alantoideana

As regiões de contato entre esses mesodermas são caracterizadas pela expressão do fator *Gcm1* no cório (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000), gene expresso especificamente em células envolvidas com o transporte de gases e nutrientes, tanto em placentas de camundongos, quanto em humanos (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000; STECCA et al., 2002). A expressão de *Gcm1* ocorre em três fases. A primeira se dá com a expressão do RNAm de *Gcm1* em poucas células do cório, sem ou com baixíssima síntese protéica. A segunda fase se dá a partir do contato entre cório e alantoide. Esse contato é essencial para o início da tradução do RNAm em proteína (STECCA et al., 2002). A fusão cório-alantoideana dispara uma onda de diferenciação das células trofoblásticas coriônicas para a formação do labirinto (Figura 3A). Na ausência de *Gcm1*, o contato entre os mesodermas ocorre, porém sem a fusão dos mesmos e sem diferenciação das células trofoblásticas coriônicas. Como consequência, não há formação de sinciciotrofoblasto e da zona do labirinto (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000).

Além de *Gcm1*, a adesão entre os mesodermas coriônico e alantoideano também depende da interação entre Itgα4 (*Integrin alpha 4,* YANG et al., 1995) - uma integrina expressa na superfície das células mesodérmicas do cório - e seu receptor Vcam1 (*Vascular cell adhesion molecule 1,* KWEE et al., 1995) - expresso na superfície das células mesodérmicas do alantoide (Figura 3A). A deleção de Itgα4 ou Vcam1 resulta no crescimento normal do alantóide, mas ausência de fusão cório-alantoideana (YANG et al., 1995; KWEE et al., 1995; SIMMONS, 2014). Defeitos na fusão também podem ocorrer com expressão normal de *ITGα4/VCAM1*, como em

casos de mutantes *Erf* (*Ets2 repressor fator*, PAPADAKI et al., 2007), sugerindo a presença de mecanismos adicionais de adesão/fusão (Figura 3A).

A terceira fase da fusão cório-alantoideana é caracterizada pela proliferação das células Gcm1^{+} e sua estruturação, descrita com detalhes a seguir. Durante essa fase, é de extrema importância a proteína intracelular Hsp90β, presente no alantoide (VOSS et al., 2000). Em sua ausência, o mesoderma alantoideano apresenta redução do seu potencial de invasão do cório (VOSS et al., 2000; STECCA et al., 2002).

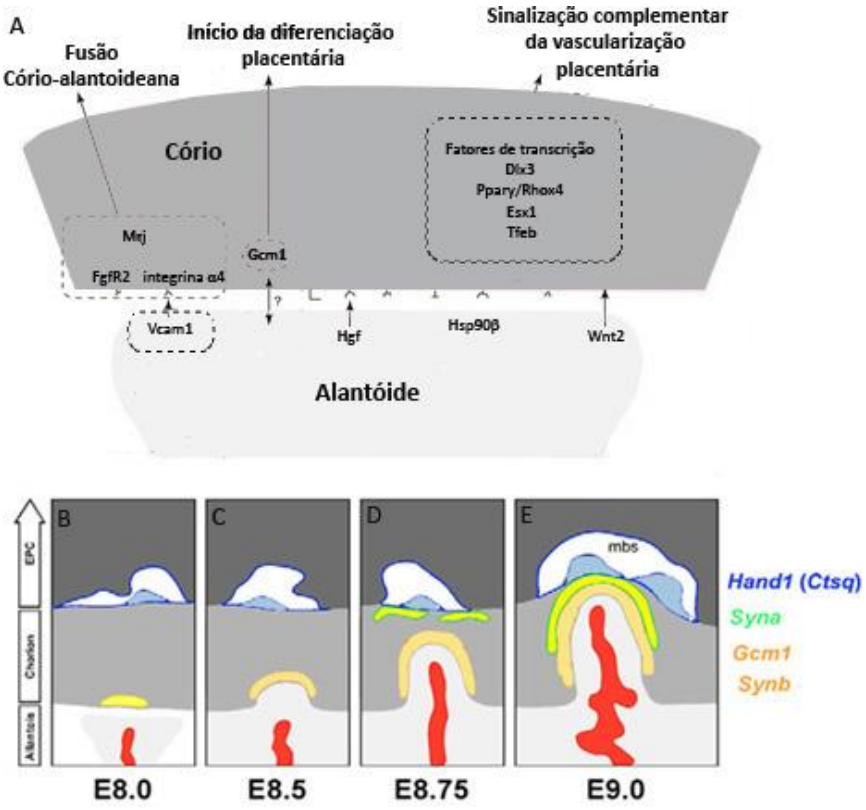

Figura 3.Representação do processo de fusão cório-alantoideana dependente da interação de fatores presentes nos mesodermas alantoideano e coriônico. (**A**): Fatores ativados e alguns de seus produtos ativados que irão influenciar o desenvolvimento do labirinto, principalmente a expressão de *Gcm1* nas células coriônicas. (**B**): Esquema da vascularização inicial do labirinto, proveniente dos vasos sanguíneos do alantoide. Esse processo ao longo do tempo se torna mais expressivo, tornando a camada do labirinto a região mais vascularizada da placenta. Modificado de Rossant e Cross, 2001 (A) e de Simmons et al., 2008 (B).

2.6.1 Morfogênese do labirinto

Após a fusão dos mesodermas coriônico e alantoideano, a membrana coriônica passa a apresentar dobras; nestes locais ocorre vasculogênese com a formação dos primeiros capilares fetais que irão irrigar a placenta (CROSS et al., 2002; WATSON; CROSS, 2005) (Figura 3B). Essas dobras possuem células que expressam *Gcm1* e que darão origem a uma das camadas sinciciais. O crescimento vascular acompanha o das dobras que crescem no interior da camada coriônica (Figura 3C-D). O componente coriônico-ectodérmico das dobras dá origem a colunas de células trofoblásticas que revestem um eixo de mesoderma cório alantoideano com vasos fetais. As células trofoblásticas formam gradativamente as camadas sinciciais e parte das células trofoblásticas gigantes, denominadas de sinusoidais (**CTG-s**) (SCOTT et al., 2000; SIMMONS; CROSS, 2007; SIMMONS et al., 2007; HU; CROSS, 2010). Em conjunto, células trofoblásticas sinusoidais, camadas sinciciais e mesoderma vascularizado formam o labirinto.

As duas camadas de sinciciotrofoblasto (camada II e III) e a camada de células gigantes (**CTG-s**, camada I) associadas aos capilares fetais formam a membrana interhemal ou barreira placentária, espaço que separa o sangue materno do sangue fetal (ENDERS, 1965; HERNANDEZ-VERDUN, 1974; COAN et al., 2005) (Figura 4). As células que dão origem a membrana interhemal são oriundas da membrana coriônica, embora, parte das células gigantes e da camada de sinciciotrofoblasto-II seja também proveniente do cone ectoplacentário (WATSON; CROSS, 2005).

O desenvolvimento inicial do labirinto pode ser acompanhado pela expressão de diferentes fatores além da expressão de *Gcm1*; um deles é o *EpCAM* (*Epitelial cell adhesion molecule*, UENO et al., 2013). A proteína transmembrana EpCAM está relacionada a adesão de células epiteliais e influencia também a manutenção do estado de pluripotência de células embrionárias humanas (LU et al., 2010). Em camundongos, seu gene homólogo (*mEpCAM*), tem relevante papel na manutenção do estado de pluripotência em células-tronco embrionárias (GONZÁLEZ et al., 2009, MCQUALTER et al., 2010) e de células progenitoras da região do labirinto (UENO et al., 2013). Essas células apresentam potencial multipotente e podem ser detectadas em pequenos arranjos celulares até o final da gestação (UENO et al., 2013; NATALE et al., 2017). Outra população de células semelhantes a células-tronco foi caracterizada recentemente no labirinto de camundongos, expressando o gene *Sca1* (*Stem cell antigen 1*, também conhecido como *Ly6A*) (NATALE et al., 2017). Essas

células são encontradas durante todo o desenvolvimento do labirinto até o final da gestação, também se restringindo a pequenos nichos, assim como as células EpCAM$^+$, e possuem alta capacidade proliferativa e de formação de colônias *in vitro* (HUGHES et al., 2013; NATALE et al., 2017).

O sinciciotrofoblasto é formado por células fusionadas e, suas duas camadas são distintas entre si, em relação à composição celular e marcadores gênicos (DUPRESSOIR et al., 2005; SIMMONS et al., 2008; HENKE et al., 2013). A camada que mantém contato com o mesoderma e células endoteliais é conhecida como sinciciotrofoblasto-III, enquanto que a camada que está em contato com as células trofoblásticas gigantes sinusoidais recebe o nome de sinciciotrofoblasto-II (Figura 4A). As células coriônicas que expressam *Gcm1* dão origem ao sinciciotrofoblasto-III, graças à indução da expressão de outro gene por *Gcm1*: *Synb* (*Sincitina B*), cuja proteína promove a fusão de células Gcm1$^+$ (DUPRESSOIR et al., 2005, 2011; SIMMONS et al., 2008). Células próximas às Synb$^+$ expressam *Syna* (*Sincitina A*), um gene que codifica uma proteína fusogênica retroviral, e que medeia a fusão das células Syna$^+$, dando origem ao sinciciotrofoblasto-II (DUPRESSOIR et al., 2005, 2011). Os fatores transcricionais que direcionam essa especificação (Syna$^+$), no entanto, não são bem elucidados. Estudos mostram que sua expressão pode estar ligada às células *Sca-1/Ly6*$^+$ (HUGHES et al., 2013; NATALE et al., 2017). Apesar da diferença entre as duas camadas de sinciciotrofoblasto, ambas são interdependentes (Figuras 4B-E). Análises morfológicas sugerem que as células do sinciciotrofoblasto-II sofrem fusão após a formação do sinciciotrofoblasto-III, gerando uma possível onda de diferenciação (HERNANDEZ-VERDUN, 1974). Baseado em observações, Hernandez-Verdun (1974) sugeriu que essas duas populações possuem progenitores diferentes, sendo o sinciciotrofoblasto-III proveniente do cório, enquanto que o sinciciotrofoblasto-II seria originário do cone ectoplacentário. Além disso, as duas camadas sinciciais mantêm-se aderidas entre si por junções oclusivas, expressando, também, diferentes proteínas transportadoras de membrana (Figura 4D). A camada II apresenta expressão apical dos transportadores de glicose Glut1, Glut3 e o transportador de monocarboxilato Mct1, enquanto que na camada III são expressos na porção basal Glut1 e Mct4 (também conhecido como Slc16A3) (NADEAU; CHARRON, 2014) (Figura 4A). A polarização correta com a expressão diferencial de proteínas nas membranas celulares parece ser influenciada pela

proteína PKCζ (*Atypical protein kinase C zeta*) e é de extrema importância para a diferenciação correta das camadas sinciciais (NADEAU; CHARRON, 2014).

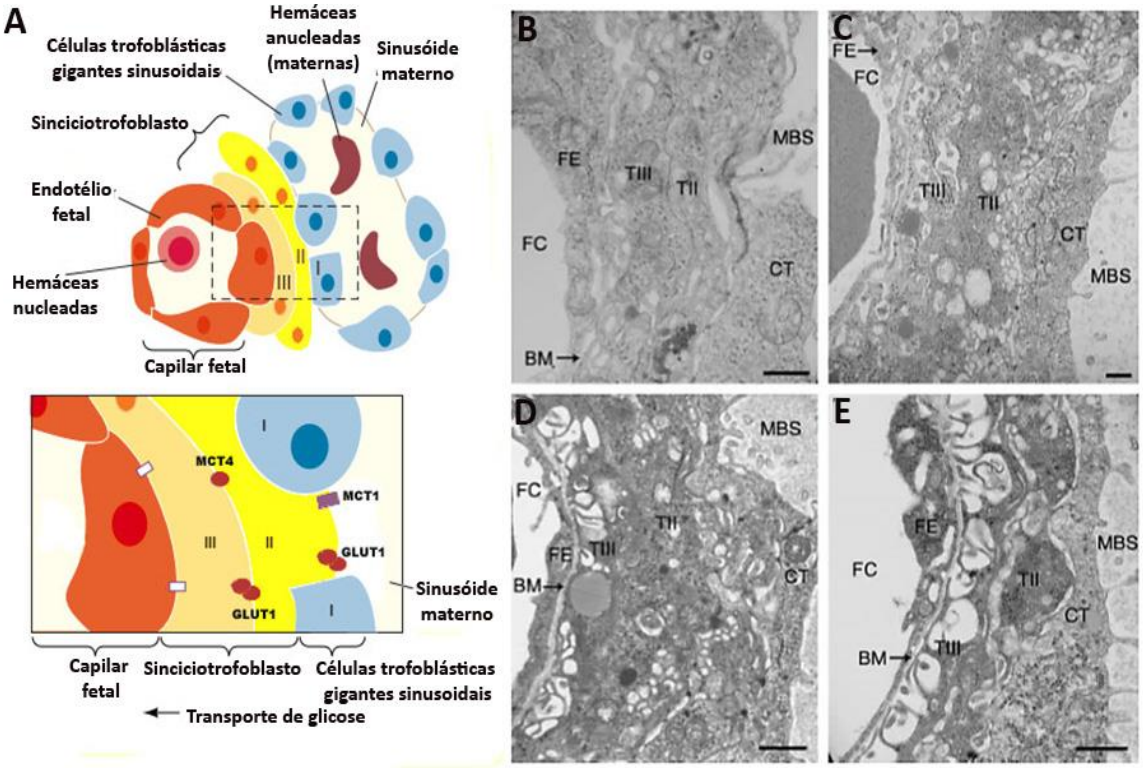

Figura 4. Representação da barreira placentária em camundongos. (**A**) Em detalhe, transportadores (Mct1, Mct4 e Glut1)presentes na superfície do sinciciotrofoblasto, responsáveis pela troca de substâncias através das camadas sinciciais (II e III). (I) Células trofoblásticas gigantes.(**B-E**) Desenvolvimento da membrana interhemal em diferentes fases gestacionais. (**B**) Dia 12,5 de gestação. (MBS) Seios de sangue materno em contato com a camada de células trofoblásticas gigantes (CT). (TII e TIII) Camadas sinciciais do trofoblasto. (FE) Endotélio dos capilares(FC) fetais. (BM) Membrana basal que separa o endotélio do sinciciotrofoblasto III. (**C-E**) Dias 14,5, 16,5 e 18,5 de gestação, respectivamente. Modificado de Watson e Cross, 2005 e Coan et al., 2005.

2.7 Vascularização placentária

A atividade invasiva das células CTG-p leva ao extravasamento do sangue materno na região do labirinto em formação (COAN et al., 2005) (Figura 5). Este por sua vez, chega ao labirinto por meio de canais revestidos por células trofoblásticas (associadas aos canais de sangue materno, **CTG-c**) que expressam *Prl2c2* além de *Prl3b1* (*Pl-II*, *Prolactin family 3, subfamily b, member 1*) durante os dias 12,5 a 18,5 de gestação (SIMMONS et al., 2007, 2014; HU; CROSS, 2010).

A passagem do sangue materno por entre as células da membrana interhemal permite a troca de gases e outros materiais de forma eficiente. Ao redor do dia 12,5 de gestação, o sangue materno também se torna oriundo de artérias uterinas por

meio da invasão e remodelamento das artérias espiraladas pelas células *trofoblásticas associadas às arterias espiraladas* (**CTG-spa,** Figura 5) (SCOTT et al., 2000; SIMMONS et al., 2007; SIMMONS; CROSS, 2007; HU; CROSS, 2010). Essas células expressam os genes: *Prl2c2 (Plf, Prolactin family 2, subfamily c, member 2), Prl7b1 (PlN, Prolactin family 7, subfamily b, member 1), Rgs5 (Regulator of G-protein signaling 5), Lnc7 (Lipocalin 7)* e *Prl4a1 (PlpA, Prolactin family 4, subfamily a, member 1*) (SIMMONS et al., 2007, 2008, 2014; HU; CROSS, 2010; MOULD et al., 2012).

Os canais trofoblásticos (revestidos pelas células trofoblásticas gigantes, **CTG-c**) que conduzem o sangue materno para o labirinto, criam uma condição de baixa resistência a estas estruturas vasculares. As **CTG-c** e as **CTG-spa** são derivadas células do cone ectoplacentário (SCOTT et al., 2000; SIMMONS; CROSS, 2007; SIMMONS et al., 2007). O sangue materno retorna à circulação por canais formados por células gigantes **CTG-ch** até o seio venoso decidual (ADAMSON et al., 2002; ZHANG et al., 2011; RAI; CROSS, 2014) (Figura 5).

O sangue fetal é transportado para a placenta por meio da artéria umbilical, que se divide em numerosas arteríolas na base da placa coriônica e forma uma extensa rede capilar na medida em que atinge as porções mais distais do mesoderma labiríntico (ROSSANT; CROSS, 2001; ADAMSON et al., 2002).

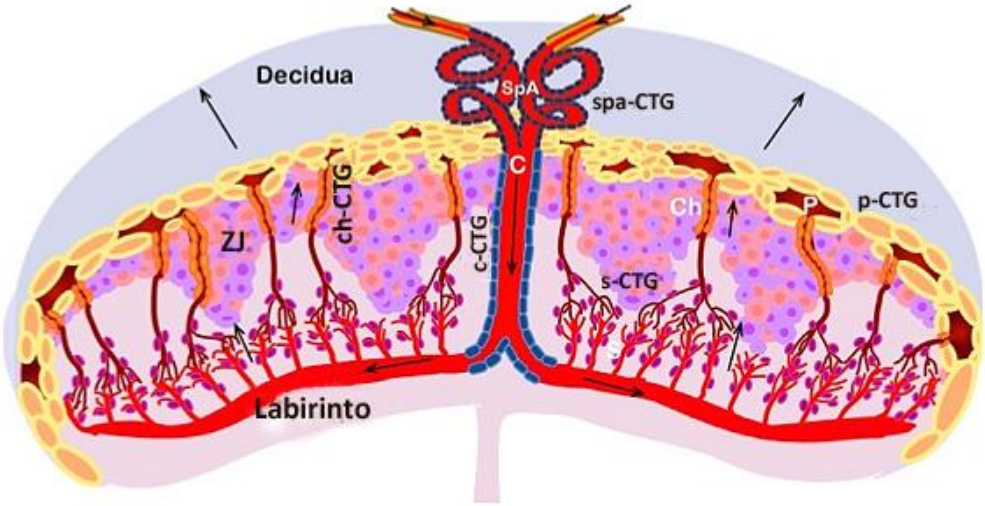

Figura 5. Representação esquemática da placenta de camundongos madura detalhando a localização das diferentes populações de células trofoblásticas gigantes e a vascularização da placenta. **CTGp**: CTG parietais que delimitam o espaço materno do fetal e estão presentes ao redor de toda a estrutura placentária. **CTGspa**: CTG associadas às artérias espiraladas. **CTGc**: CTG associadas a canais que conduzem o sangue materno das artérias espiraladas para o labirinto.

CTGs: CTG sinusoidais que fazem parte da constituição da barreira placentária. **CTGch**: CTG associadas a canais de sangue que coletam o sangue dos sinusoides para o seio venoso da decídua. C: canal materno. SpA: artérias espiraladas; Ch: canais de sangue provenientes dos sinusoides maternos. ZJ: zona juncional. Modificada de Rai e Cross, 2014.

2.8 Formação do sinciciotrofoblasto em humanos

Na placenta humana, a formação da região de trocas correspondente ao labirinto em camundongos é a região vilosa e tem sido bastante estudada. Estas estruturas são revestidas por sinciciotrofoblasto e repousam sobre células individualizadas citotrofoblásticas vilosas (Figura 6). No início da gestação essas células possuem alta capacidade proliferativa, sendo consideradas células progenitoras, à semelhança das células $EpCAM^+$ em camundongos (NATALE et al., 2017) (Figura 6). Durante a gestação, a proliferação destas células diminui relevantemente de modo a serem raramente encontradas no terceiro trimestre (revisto por GUDE et al., 2004).

A proliferação destas células alimenta a camada de células multinucleada que se fusionam para formar o sinciciotrofoblasto (ENDERS, 1965; BURTON et al., 2003). Assim como em camundongos, o processo de fusão que dá origem ao sinciciotrofoblasto também pode ser dividido em três fases. No estágio 1 as células do citotrofoblasto tem sua capacidade proliferativa diminuída e se tornam competentes ao fusionamento através da expressão de fatores específicos. No estágio 2, há a adesão célula-célula, originando junções comunicantes entre elas. No estágio final, ocorre união das membranas plasmáticas das células contiguas, dando origem à camada multinucleada sincicial (GERBAUD; PIDOUX, 2015).

Proteínas envolvidas na fusão sincicial humana são as SINCITINAS - proteínas codificadas a partir de retrovírus endógenos (HERV) incorporados há milhões de anos ao material genético humano - e com alta capacidade de fusionamento quando ativadas (MI et al., 2000; YU et al., 2002; FRENDO et al., 2003; BLAISE et al., 2003; HUPPERTZ et al., 2006).

As SINCITINAS 1 e 2 humanas são distintas das Sincitinas A e B encontradas na barreira placentária de camundongos, embora possuam características semelhantes (DUPRESSOIR et al., 2005; LAVIALLE et al., 2013). Também ocorre um aumento na expressão destas proteínas durante o processo de diferenciação do citotrofoblasto (revisto por COSTA, 2016). Um importante fator para a transcrição dos genes

SINCITINA1 (SINC1) e SINCITINA2 (SINC2) é a proteína GCM1 (BACZYK et al., 2004; HUPPERTZ et al., 2006), crucial para o processo de fusionamento das células citotrofoblásticas humanas (YU et al., 2002; BACZYK et al., 2009; LIANG et al., 2010).

Recentemente, importantes fatores reguladores do processo de sincicialização das células trofoblásticas humanas foram reportados. O silenciamento do gene *TWIST1* (*Twist family bHLH transcription factor 1*) provocou a diminuição da expressão de *GCM1*, impedindo o processo de sincicialização das células de coriocarcinoma humano BeWo, assim como em condições de hipóxia em explantes de placentas humanas (LU et al., 2016). Além disso, as proteínas SUPRESSINAS *(SUPPRESYNS)* codificadas a partir de retrovírus endógenos, ao contrário das SINCITINAS, inibiram a sincicialização. Estas proteínas se ligam ao receptor, ASCT2 das SINCITINAS (BLOND et al., 2000), embora não alterem a atividade fusiogênica da SINCITINA 2 (SUGIMOTO et al., 2013; revisto por COSTA, 2016).

Além do envolvimento da expressão de SINCITINAS e seus receptores e de metaloproteases (HUPPERTZ et al., 2006), o processo de fusionamento das células citotrofoblásticas também tem sido associado às fases iniciais do processo de apoptose (HUPPERTZ et al., 1999). Em linhas gerais, os estágios iniciais da apoptose parecem estar relacionados a interrupção do ciclo celular e entrada em um processo de diferenciação que culmina com a sincicialização do trofoblasto.

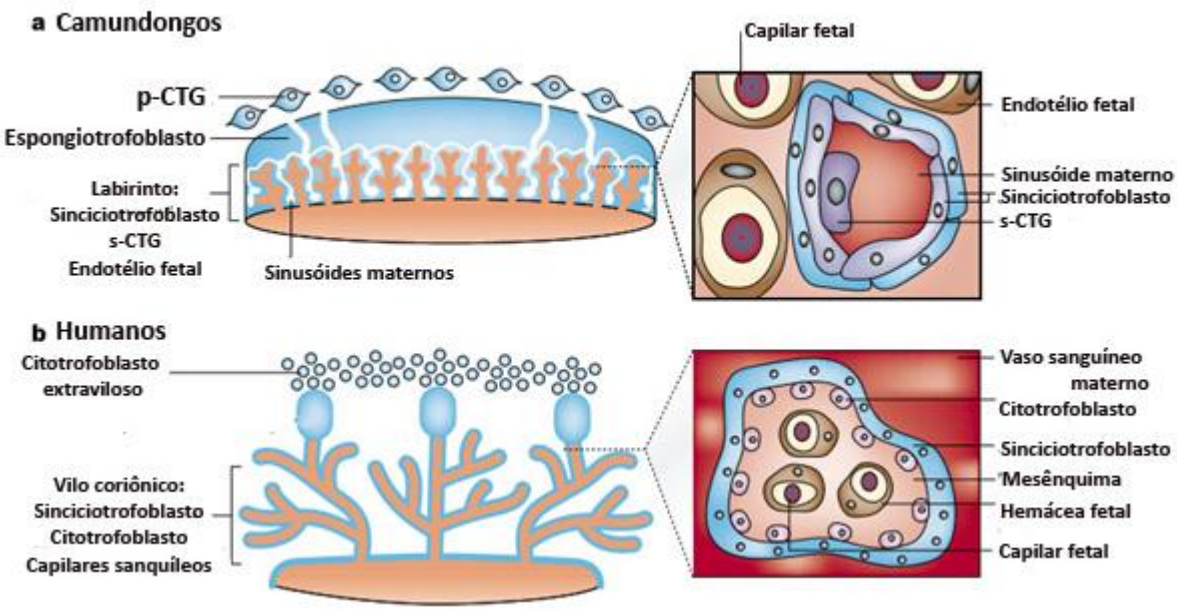

Figura 6. Comparação morfológica entre as placentas de camundongos (A) e humanos (B). Em maior aumento, detalhe de como a barreira placentária é estruturada em cada espécie. (**A**): Em camundongos, a camada de sinciciotrofoblasto é dupla, enquanto que em humanos (**B**), essa camada é simples e proveniente da fusão de células citotrofoblásticas, camada encontrada principalmente no início da gestação e que depois se torna menos frequente ao decorrer da mesma. Modificado de Rossant e Cross, 2001.

2.8.1 Caspases e sua participação na formação do sinciciotrofoblasto humano

Proteínas Caspases são caracterizadas por possuírem um resíduo de cisteína e um resíduo de ácido aspártico. São sintetizadas como zimógenos inativos, ou pró enzimas, que possuem pouca ou baixa significância em sua atividade proteica; mesmo assim, o processo de sua síntese é extremamente regulado para que não sejam ativadas em momento não apropriado ou ocorram falhas em sua estruturação (PARRISH et al., 2013; GRAF et al., 2014).

Atualmente, sabe-se que as Caspases atuam em processos celulares relacionados a apoptose e não-apoptóticos. Entre suas funções não relacionadas com a morte celular programada, estão contribuições em processos de migração celular (principalmente de células tumorais) através de moduladores da Actina, ativação de Calpina 2 e Rab-2 (GRAF et al., 2014), recrutamento de citocinas pró-inflamatórias (LI; YUAN, 2008; CULLEN; MARTIN, 2009), diferenciação de eritrócitos e de queratinócitos (LAMKANFI et al., 2007; PARRISH et al., 2013), entre outros.

A família das Caspases é classificada em duas subfamílias de acordo com o momento em que atuam na cascata de apoptose e com suas estruturas e substrato. As iniciadoras ou de pró-domínios longos (Caspases-2, -8, -9 e -10) são ativas no começo da cascata de apoptose; as efetoras ou de pró-domínios curtos (Caspases-3, -6, -7 e -14) são ativadas ao final do processo de morte, levando à apoptose propriamente dita (FRASER; EVAN, 1996; MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; PARRISH et al., 2013; GRAF et al., 2014).

A cascata apoptótica possui duas vias de atuação principal a via extrínseca e a intrínseca. A primeira envolve sinalização externa à célula, dependente de interação com proteínas receptoras de membrana, como, por exemplo, é o caso do receptor Fas (*Cell surface death receptor*) e seu ligante Fas-L (*Cell surface death ligand*, RUNIC et al., 1996; DANIAL; KORSMEYER, 2004; PARRISH et al., 2013). A

interação entre eles induz a oligomerização da proteína receptora, promovendo ativação de um grupo de proteínas ligadas ao seu domínio intracelular. Esses complexos, também reconhecidos como DISC (*Death-induced signaling complexes,* KISCHKEL et al., 1995; LAVRIK et al., 2003), se ligam aos pró-domínios das Caspases iniciadoras, principalmente as Caspases-8 e -10, promovendo sua dimerização e ativação. Por outro lado, a via intrínseca, é ativada principalmente por proteínas relacionadas ao estresse celular como a proteína Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), membro pró-apoptótico da família de proteínas Bcl-2. Quando ativada, essa proteína interage com as proteínas Bax/Bak pertencentes à mesma família resultando na alteração da permeabilização da membrana plasmática da mitocôndria, com liberação de citocromo c para o citoplasma (BILLEN et al., 2009; PARRISH et al., 2013). O citocromo interage com a proteína Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) resultando na estruturação do complexo apoptossomo, o qual recruta e ativa a Caspase-9 (ACEHAN et al., 2002; BOATRIGHT et al., 2003). Essa Caspase, por sua vez, é responsável pela clivagem e ativação de outras caspases, como a Caspase-3 e pelo prosseguimento do mecanismo de morte celular (SLEE et al., 1999; PARRISH et al., 2013)

Em humanos, observou-se que o início do processo de fusão sincicial nas células citotrofoblásticas pode estar relacionado com a ativação dos iniciadores da cascata de apoptose – Caspase-8 e -10 (HUPPERTZ et al., 1999) e expressão de: Fas, Fas-L, do receptor p55 (*Oncogene protein p55*, v-myc), de p75 (*Lens epithelium-derived growth fator*), do fator de necrose tumoral TNF-α (YUI et al., 1996) e de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*, MARZIONI et al., 1998) (Figura 7). O final do processo, no sinciciotrofoblasto, seria mediado pelos efetores da mesma cascata – Caspase-3, -6 e -7, encontradas no citotrofoblasto em sua forma inativa (BURTON et al., 2003).

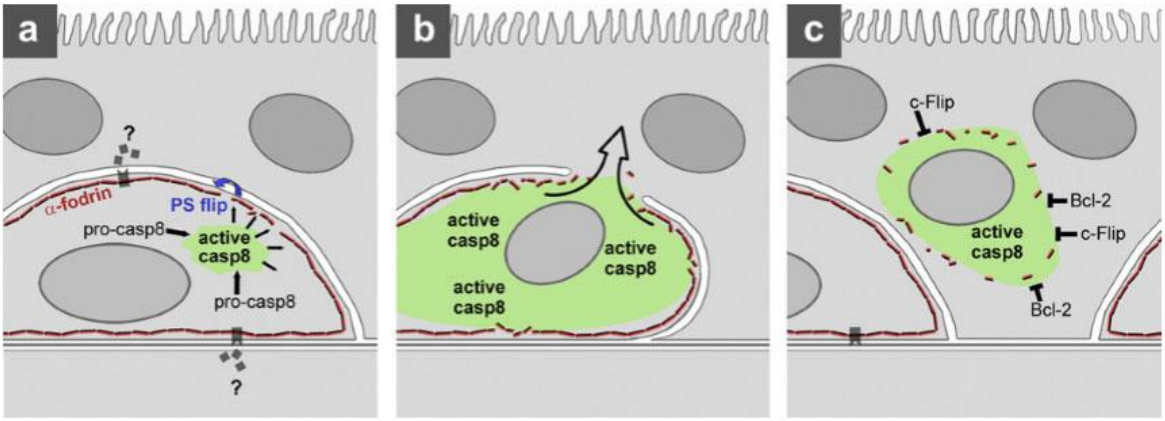

Figura 7. Esquema representativo da fusão de células citotrofoblásticas dependente de caspase 8 no vilo trofoblástico humano. Em algumas células citotrofoblásticas caspases iniciadoras, como a Caspase-8, são ativadas através da interação entre fatores ainda não bem elucidados. Essa ativação resulta na clivagem de alfa-fodrina e a externalização de PS-flipase na membrana plasmática, permitindo o processo de incorporação de mais células na camada de sinciciotrofoblasto. Logo após, fatores bloqueadores da cascata de apoptose, como os da família Bcl-2 são ativado, bloqueando o processo de morte celular. Modificado de Gauster e Huppertz, 2010

Nesta hipótese, a ativação Pró-Caspase-8 em Caspase-8 no citotrofoblastoseria promovida pela interação do ligante (TNF-α) com seu receptor (TNF-R1) (YUI et al., 1996; HUPPERTZ et al., 1999), resultando na clivagem de proteínas que ligam o citoesqueleto à membrana plasmática, como a α-Fodrina. Esta clivagem levaria à externalização da fosfatidilserina (OS) na membrana plasmática (por meio da ativação da enzima fosfatidilserina flipase, sendo esses dois processos necessários para que a fusão ocorra (Figura 7A) (YUI et al., 1996; HUPPERTZ et al., 1998, 1999; PÖTGENS et al., 2002).

A externalização da fosfatidilserina é uma característica do início do processo de apoptose (ROTE et al., 2010) e um componente necessário para a fusão do citotrofoblasto. Este processo provoca a desestruturação do citoesqueleto e desorganização da membrana plasmática permitindo a interação entre os domínios apical do citotrofoblasto e basal do sinciciotrofoblasto, e consequentemente a incorporação de novas células a esta camada (Figura 7B). Também foi observado que alterações na ativação e expressão de Caspase-8 podem impedir a fusão sincicial, resultando em um acúmulo de camadas no citotrofoblasto (BLACK et al., 2004). Corroboram esses dados, estudos em que a externalização de PS foi bloqueada em células BeWo, tratadas com forscolina, um conhecido indutor

farmacológico de sincicialização. Esta inibição alterou a diferenciação das células citotrofoblásticas e sua fusão para a formação do sincício (ADLER et al., 1995; VOGT et al., 1996; ROTE et al., 2010).Para que a externalização da fosfatidilserina não seja reconhecida pelo sistema imunológico como as demais células em processo de morte celular, o sinciciotrofoblasto humano sintetiza e externaliza grande quantidade de ABCG2 (*Breast cancer resistance protein 2*), um transportador de lipídeos, que serve como “fator de proteção”, embora não se conheça como ele impede o processo de morte celular (EVSEENKO et al., 2007; ROTE et al., 2010).

Após a fusão, as células citotrofoblásticas expressam altos níveis de inibidores de apoptose (MCL-1, *Myeloid cell leucemia 1*, e BCL-2, *B cell leukemia/lymphoma 2*) interferindo com a atividade da Caspase-8 e -10 e, desta forma, bloqueando a progressão da cascata (HUPPERTZ et al., 2001, 2005; BURTON et al., 2003) (Figura 7C).

Estes resultados, entretanto, receberam críticas em dois estudos recentes. Rote e colaboradores (2010) analisaram a externalização da fosfatidilserina e mostraram que isso pode ocorre independentemente da ativação da cascata apoptótica, questionando a dependência de ativação da Caspase-8 para o processo de fusão trofoblástica. Os autores sugeriram que a Pró-Caspase-8 contribui com a diferenciação citotrofoblástica e sua forma ativa na clivagem da α-fodrina, em um estágio final da fusão (GAUSTER et al., 2009; ROTE et al., 2010). Em suma, os autores não contestaram o papel que a Caspase-8 exerce no processo de diferenciação citotrofoblástica, porém sugerem diferentes formas de envolvimento no processo de sincicialização trofoblástica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo analisar em camundongos o processo de diferenciação das camadas sinciciais trofoblásticas do labiríntico placentário, avaliando a participação da Caspase-8 nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

I) Caracterizar morfologicamente as etapas de diferenciação da placa coriônica de camundongos em cortes histológicos nos dias 8,5 a 11,5 de gestação.

II) Isolar, cultivar e caracterizar células isoladas da placa coriônica de placentas de camundongo obtidas no dia 9,5 de gestação, visando a caracterização da morfogênese sincicial.

III) Analisar a expressão de Caspase-8 e Pró-Caspase-8 durante a fase de diferenciação das camadas sinciciais do labirinto *in vivo* e *in vitro*.

IV) Analisar a possível participação de Caspase-8 em ensaios *in vitro*, na expressão de marcadores da diferenciação labiríntica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus domesticus*) da linhagem CD1, mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, sob regime *ad libidium* de água e ração granulada. Fêmeas virgens de aproximadamente três meses foram colocadas em gaiolas com machos na proporção de 2:1 ao final da tarde. Na manhã seguinte foi verificada a presença de rolha vaginal sendo este considerado metade do primeiro dia de gestação (dg).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP Nº 104/2015) (em anexo).

4.2 Coleta das amostras

As fêmeas prenhes foram sacrificadas por deslocamento cervical nos dias 8,5 a 11,5 de gestação, sendo, em seguida, laparatomizadas para a remoção dos seus cornos uterinos. Cada dilatação uterina foi seccionada transversalmente para que, desse modo, pudessem ser expostos os tecidos materno e embrionário adjacentes. Todo o procedimento foi realizado em condições de assepsia e cuidados para evitar a contaminação do material com microrganismos.

Para as análises morfológicas e de imunohistoquímica, um total aproximado de 20 sítios de implantação foram obtidos a partir de diferentes coletas (n=9). Essas amostras foram fixadas em Methacarn, de 2 a 4 horas, a 4ºC, como detalhado no item 4.4.

Para ensaios *in vitro* e para a extração de RNA e de proteínas para ensaios de RT-PCR e *Western blotting* (respectivamente), as regiões placentárias foram isoladas dos embriões e tiveram suas regiões pré-labirínticas (região da placa coriônica, dia 8,5 e 9,5 de gestação) e labirínticas (dia 10,5 de gestação) dissecadas com o auxílio de bisturis oftalmológicos (Figura 8), sob estéreo microscópio Discovery V8 Stereo (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Durante todo o procedimento de isolamento, os fragmentos uterinos permaneceram em tampão fosfato (PBS) gelado. Para a extração de RNA e de

proteínas, amostras de três regiões labirínticas distintas, porém provenientes de um mesmo animal, foram coletadas e processadas como um lote (*pool*). Um total aproximado de 12 lotes foram obtidos a partir de aproximadamente 36 placentas provenientes de 12 animais, coletados de ensaios em diferentes momentos.

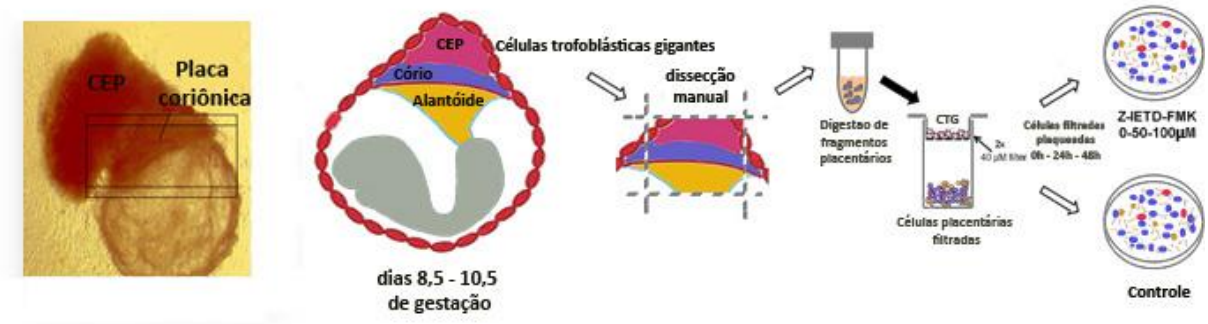

Figura 8. Esquema ilustrando o isolamento da porção labiríntica de placentas de dia 9,5 de gestação. A porção da placa coriônica e região labiríntica foram isoladas através de bisturis oftalmológicos. Em seguida passaram por um processo de digestão, através de uma solução de tripsina/EDTA, colagenase e DNAse I, foram filtradas a fim de se reter as células trofoblásticas gigantes, coletando-se somente as células de interesse, que posteriormente foram plaqueadas em placas de cultivo celular e prosseguidas com os tratamentos respectivos.

4.3 Isolamento e cultivo de células labirínticas nos dias 8,5, 9,5 e 10,5 de gestação

As células labirínticas foram isoladas a partir da porção labiríntica de fêmeas prenhes nos dias 8,5, 9,5 e 10,5 de gestação (Figura 8). As regiões labirínticas foram dissecadas sob microscópio estereoscópico Discovery V8 Stereo (Carl Zeiss), com a ajuda de bisturis oftálmicos, em PBS estéril gelado, de modo a remover o máximo possível de células gigantes e tecidos embrionários. Estas regiões foram então lavadas 3 vezes em meio de cultura D-MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e posteriormente transferidas para tubos estéreis de 50mL (Falcon, Tewksbury, MA, EUA) para a dissociação enzimática das células. Fragmentos obtidos no dia 8,5 de gestação foram tratados com 2 mL de solução de Tripsina 0,2%/EDTA 0,02% (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), enquanto que os obtidos nos dias 9,5 e 10,5 de gestação foram tratados com colagenase II (1 mg/mL, Sigma-Aldrich), DNAse I (0,1 mg/mL, Sigma-Aldrich) e 0,04 %de solução de Tripsina 0,2%/EDTA 0,02%(Instituto Adolfo Lutz). Os tubos foram mantidos em banho Maria a 37°C, por 1 a 5 min. Em seguida, essa solução de dissociação foi inativada com meio D-MEM (Sigma-Aldrich) contendo 20% de soro bovino fetal (SBF, CULTILAB AS, Campinas, Brasil), na proporção 1:1 (v/v), durante 5 min.

Após a digestão, as células passaram por filtro com malha de 70 µm e em seguida, duas vezes por filtro de 40 µm (*Cell Strainer,* BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) para a retenção de células trofoblásticas gigantes. As células que atravessaram as malhas dos filtros foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm, a 4°C, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em meio D-MEM. Amostras provenientes dos dias 9,5 e 10,5 de gestação foram ressuspendidas em solução de hemólise (0,83 % de cloreto de amônio em meio D-MEM), aonde permaneceram a temperatura ambiente por 5 mine novamente centrifugadas (1500 rpm, 4°C, 5 min). As células obtidas foram então ressuspendidas em meio D-MEM suplementado com 20 % SBF, insulina (0,1 %), anfotericina, gentamicina, antibióticos (100 U/mL penicilina e 10 mg/mL estreptomicina) (Vitrocell, Campinas, Brasil), 0,05 mg/mL piruvato de sódio (Sigma-Aldrich) e 0,5 mg/mL lactato de cálcio (Sigma-Aldrich)

Após contagem e avaliação da viabilidade celular pela exclusão do azul de Tripan (GE, Boston, Massachusetts, EUA) em contador automático (Countess, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), as células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços, contendo ou não lamínulas (13 mm de diâmetro, Glasscyto, LabFast, São Paulo, Brasil), na concentração de $2{,}5x10^4$ células/mL para os ensaios de morfologia e imunohistoquímica e de $1{,}0x10^5$ células para os ensaios de RT-PCR e *Western Blotting*. As células permaneceram em cultura por um período de até 48 horas, em incubadora úmida com 5% de CO_2, a 37°C. O meio das culturas foi renovado após 6h do plaqueamento inicial, e posteriormente a cada 24 horas. Foram retirados pontos experimentais de 6, 24 e 48 horas. Nestes pontos experimentais também foram realizados análise do crescimento celular e a viabilidade através de contador automático (Countess).

4.4 Análise morfológica dos sítios de implantação

As amostras de placentas coletadas nos dias 8,5 a 11,5 dias de gestação foram fixadas em Methacarn (6:3:1 v/v álcool metílico, clorofórmio, ácido acético glacial) de 2 a 4horas, a 4ºC. Após a fixação, o material foi lavado e mantido em etanol 100% até ser colocado em processador automático de tecidos (LeicaTP1020, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) programado para dois banhos de álcool 100%, dois banhos sucessivos de xilol (clarificação; 1h30min cada) e impregnação em

parafina líquida quente (três banhos; 1h30min cada). Após este processamento, todas as amostras foram incluídas em Histosec® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) utilizando o processador de tecidos Leica EG1160 (Leica Microsystems).

Secções de 5µm de espessura foram então obtidas em um micrótomo Ergostar HM 200 (Microm, Walldorf, Alemanha). Após desparafinização rotineira e hidratação das amostras, procedeu-se à coloração com Hematoxilina de Harris por 3 minutos, seguida de coloração com Eosina por 1 minuto. Os cortes foram então desidratados em uma série de concentrações crescentes de etanol, diafanizados e montados com lamínulas, utilizando-se o meio de montagem Tissue-Tek Mount (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA).

4.5 Caracterização das células cultivadas

As células cultivadas em lamínulas foram retiradas das culturas nos tempos de 6 (ponto zero), 24 e 48 horas, lavadas em PBS 1M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich), 37ºC e fixadas em 2% paraformaldeído diluído em PBS 1M, pH 7,8 (Sigma-Aldrich) por 20 min, a 4°C. Para análises morfológicas, as amostras foram lavadas em PBS e coradas com hematoxilina de Harris por, aproximadamente, 30 segundos, seguida de lavagem em água destilada. Em seguida, foram coradas com eosina aquosa por 30 segundos, lavadas em água de torneira, deixadas para secar em estufa e finalmente montadas com meio de montagem Tissue-Tek Mount (Sakura Finetek).

4.6 Imunolocalização de marcadores de diferenciação

Parte dos cortes obtidos dos sítios de implantação nos dias 8,5, 9,5, 10,5 e 11,5 de gestação e lamínulas retiradas das culturas foram também submetidas à análise imunohistoquímica após desparafinização e hidratação. As amostras provenientes de cortes histológicos foram lavadas em tampão TRIS-salina (TBS) (Sigma-Aldrich) 1M e submetidas a resgate antigênico com tampão citrato de sódio (Springer Bioscience), pH 6,0 (diluído 1:100 (v/v) em água destilada), por 3 minutos a 95°C. As amostras provenientes de cultivo não foram submetidas ao resgate antigênico. Todas as amostras tiveram então a peroxidase endógena bloqueada com a incubação em 3 % peróxido de hidrogênio (H_2O_2, Synth, Diadema, Brasil) em TBS 1M por 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com a incubação

das amostras em 1 % albumina sérica bovina em TBS 1M, durante 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram incubadas com diferentes anticorpos primários (Tabela 1) em câmara úmida a 4°C, por uma noite. Os anticorpos secundários foram utilizados a temperatura ambiente, no escuro, durante 1 hora em câmara úmida. A revelação foi realizada com o kit *SIGMAFAST™ 3,3'-diaminobenzidine* (DAB) (Sigma-Aldrich). Os controles negativos não foram incubados com os anticorpos primários. As amostras foram contracoradas com Hematoxilina de Harris e as imagens visualizadas em microscópio de luz convencional. As imagens foram capturadas pelo software Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics Inc. Rockville, MD, EUA) e Zen (Carl Zeiss).

Tabela 1–Lista de anticorpos utilizados nesse estudo

Anticorpos	Empresa	Diluição
anti-EpCAM	Abcam (ab#71916)	1:150
anti-Slc16A3	Abcam (ab#190497)	1:200
anti-TROMA-I (CK 8/18)	DSHB (ab#531826)	1:50
anti-CD31	Abcam (ab#28364)	1:50
Goat anti-rabbit IgG H&L - Horseradish peroxidase	Abcam (ab#6721)	1:200

4.7 Análise da morte celular por apoptose

A presença de células em processo de morte celular por apoptose (TUNEL) na região de formação do labirinto foi investigada em cortes histológicos provenientes de sítios de implantação nos dias 8,5, 9,5, 10,5 e 11,5 de gestação. Esta análise foi realizada utilizando-se o kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche Molecular System, NJ, USA) conforme as indicações do fabricante. Brevemente, os cortes histológicos desparafinizados e hidratados foram lavados TBS 1M (Sigma-Aldrich) e permeabilizados com tampão citrato de sódio (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, EUA), pH 6,0, diluído 1:100 (v/v) em água destilada, por 5 minutos a 95°C. O bloqueio da fosfatase endógena foi realizado com a incubação das amostras em 10% ácido acético em água destilada por 10 minutos. Os cortes foram incubados em 500 µL de solução de marcação (450 µL *label solution* e 50 µL de *enzyme solution*, conforme recomendação do fabricante) e mantidos por uma noite, a 4°C, em câmara úmida. As lâminas foram então novamente lavadas em TBS e incubadas com *AP Converter ready-to-use* (anti-fluoresceína conjugada com fosfatase alcalina), durante

1 hora temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante. Os controles negativos foram incubados somente com *label solution*, sem a adição da enzima. A reação foi revelada com *SIGMA FAST™ Fast Red TR/Napthol AS-MX* (Sigma-Aldrich), contracoradas com hematoxilina de Harris e, por fim, montadas com meio de montagem e fotografadas em microscópio de luz convencional (Carl Zeiss).

A presença de células trofoblásticas em processo de morte celular por apoptose também foi investigada por meio da imunolocalização de Citoqueratina 18 clivada (M30). As reações imunohistoquímicas seguiram protocolo semelhante ao da detecção de processo de morte celular por apoptose, com as seguintes incubações sequenciais: solução bloqueadora de sítios inespecíficos 3 % BSA, 1 % glicina, 0,025 % Triton X-100 em TBS 1M, por 30 min; solução bloqueadora *Rodent Block M* (#RBM961, Biocare Medical Inc., Concord, CA, EUA), durante 30 min; anticorpo primário M30 (IgG de camundongo anti-citoqueratina 18 clivada por caspase, diluído 1:50 em solução 3 % BSA, 1 % glicina, 0,02 5% Triton X-100 em TBS 1M, #2156857, Roche Molecular System); anticorpo secundário IgG de coelho anti-camundongo biotinilado (#BA-9200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), diluído 1:100 em TBS 1M, durante 1h, mantido a temperatura ambiente, posteriormente incubado com o complexo estreptoavidina-biotina-fosfatase alcalina (1:400) (Vector Laboratories Inc.) por 30min, e revelação com *SIGMA FAST™ Fast Red TR/Napthol AS-MX* (Sigma-Aldrich).

4.8 Análise da expressão gênica para caracterização do processo de diferenciação labiríntica

Regiões labirínticas e pré-labirínticas dissecadas aos 8,5, 9,5 e 10,5 dias de gestação e culturas de células isoladas destas amostras tiveram a análise da expressão gênica de marcadores da diferenciação trofoblástica realizada por RT-PCR. Uma vez obtidas estas amostras foram lavadas em PBS estéril gelado, imersas em Trizol® (Ambion, Life Tech. Corp., Carlsbad, California, EUA) e armazenadas em freezer -80ºC até o momento de seu processamento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, pelo menos em três diferentes experimentos.

4.8.1 Extração de RNA

A extração do RNA total das amostras após a coleta foi realizada por Trizol®, de acordo com as especificações do fabricante. Os tecidos maiores (placentas dos dias

gestacionais 10,5 e 11,5) foram anteriormente homogeneizados com o auxílio do homogeneizador de tecidos PreCellys 24 (Uniscience, Miami, FL, EUA), enquanto que os tecidos menores (placentas dos dias gestacionais 8,5, 9,5 e cultivos celulares) foram homogeneizadas com o auxílio de agulha acoplada a seringa de 26G. Após a homogeneização, foi adicionado às amostras clorofórmio gelado (v/v) seguindo-se centrifugação por 15min, 12.000g, 4°C. Isolando-se o RNA sobrenadante do restante dos resíduos, foi adicionado isopropanol gelado (v/v) e novamente centrifugado por 15min, 12.000g, 4°C. Os pellets formados foram então ressuspendidos em etanol 75 % (v/v) e centrifugados por 10min, 8.000g, 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* formados ressuspendidos em 20µL de água DEPC. Foram então aquecidos a 60°C, durante 10 min e depois quantificados (NanoDrop 1000, Uniscience Corp., Miami, Flórida, EUA) e armazenados em freezer -80°C até o momento de processamento do cDNA. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria (absorbância 260 nm) e a pureza foi avaliada pelas razões encontradas entre os parâmetros 260/280 e 230/260 nm.

4.8.2 Geração de cDNA

Os cDNAs das amostras foram obtidos a partir do Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Anteriormente à geração dos cDNAs as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen) para a remoção de DNA genômico durante 15 min, a 25°C, em uma solução contendo 0,4µL de DNase I, 0,4µL solução tampão DNase 10x e água DEPC para um volume final de 9,5µL. O bloqueio da reação foi realizado com 0,5µL de EDTA 25mM, durante 10min, a 65ºC.

Para cada 0,5µg de RNA foi adicionado 2µL 10x RT Buffer, 2µL *Random Primers*, 0,8µL DNTP Mix, 0,5µL da enzima e 4,7µL de água DEPC, completando um volume final de 20µL. Em termociclador, essas amostras foram incubadas a 25°C durante 10min, dois ciclos de 37°C por 60min, 85°C por 5seg e 4°C até o final da reação. As amostras foram quantificadas (NanoDrop 1000, Uniscience Corp.) e armazenadas em freezer -20°C até o momento da amplificação dos genes de interesse.

4.8.3 Ensaio por PCR em Tempo Real

4.8.3.1 Primers

Os primers foram desenhados com a ferramenta *PrimerQues*t disponível no endereço: *https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index*, a partir da sequência de RNAm de referência dos genes de interesse (RefSeq RNA, NCBI) de *Mus musculus*. Os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a estar sobre uma junção éxon-éxon e amplificar todos os transcritos variantes, quando houvessem. Por fim, com a ferramenta OligoAnalyzer 3.1 (IDT, San Diego, EUA), os *primers* foram analisados a fim de descartar aqueles que favoreciam a formação de *hairpins*, homodímeros e heterodímeros e que reconhecessem outras regiões que não a de interesse. A tabela 2 mostra os genes e as sequências de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho, incluindo o gene utilizado como normatizador (*Ywhaz*).

4.8.3.2 Reação de RT-PCR

Para a reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) foi utilizado o reagente Taq DNA Polimerase Reversa Recombinante (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, 1µL de cDNA foi incubado em solução contendo 2,5µL 10x Buffer, 1,0µL 50nM MgCl, 0,5µL 100mM DNTP Mix, 2,0µL primer *reverse* 10pmol/µL, 2,0µL primer *foward* 10pmol/µL e água milliQ a fim de completar um volume final de 25µL. Essa solução foi aquecida em termociclador a 94°C por 2 min, em seguida foi adicionado a cada uma 0,2µL Taq DNA Polimerase 5U e então foram submetidas a 40 ciclos de 94°C por 1min, temperatura de anelamento específica de cada primer (Tabela 2) por 1min30seg e 72°C por 1min30seg. Por fim as amostras passaram por uma fase de amplificação a 72°C por 5 min, sendo, em seguidas, resfriadas a 4°C e posteriormente armazenadas a -20°C.

A fim de analisar a expressão semi-quantitativa das amostras, foram feitos géis de agarose 1 %, contendo 0,02 % de brometo de etídio, submetidos à voltagem constante de 77V durante 15min. A expressão gênica foi observada a partir do transiluminador G-Box (G:BOX Chemil-R, Syngene, MD, EUA) e quantificada a partir do software ImageJ 1.4 (NIH, EUA).

Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos e suas sequências utilizados na técnica de RT-PCR

Gene			Sequência oligos (5' – 3')	
Símbolo	**Entrez ID**	**Temp. Anelamento**	**Foward**	**Reverse**
Gcm1	14531	57°C	TAGCTCTGACAACTGGAGTAGA	CAAAGAGATACTGAGCTGGGAC
SynA	214292	56,2°C	CTGCCTGACTCATTCTGTATC	GTCTCTTGTACTGGGACTCT
SynB	239167	65,4°C	GTCTGACCTCTCACCTCATA	GGATCCTTGAGTCCTGAAAC
Dlx3	13393	56°C	CCTCCCTTGTGGTTTCCTATTT	GTAAGAAGAGACAGACGTGGTG
EpCAM	17075	56ºC	CAAGTCTGGGAGGAGGATAA	ACTGCTTGGCTTTGAAGAG
*Ywhaz**	22631	55°C	GAAGCCACAATGTTCTTGGCCCAT	AAACCAACAGCGACTTGGAAGCAC

*: gene endógeno (normatizador)

4.9 Análise proteica dos marcadores de diferenciação das células labirínticas (*Western blotting*)

As porções labirínticas isoladas e as culturas cultivadas por 6, 24 e 48 horas foram lavadas com PBS gelado, coletadas e armazenadas em tampão RIPA acrescidos de inibidor de protease e fosfatase 1x (Sigma-Aldrich) e ortovanadato de sódio 1mM (Sigma-Aldrich) em freezer -80ºC até o seu processamento, para a análise da atividade proteica de Caspase-8. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de agulha acoplada em seringa de 26G. Os produtos foram centrifugados por 10 minutos, a 11.000 rpm, a 4ºC e o sobrenadante separado e armazenado. As amostras foram quantificadas utilizando-se o Reagente Bradford (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, California, EUA) diluído 4 vezes em água destilada em uma placa de ELISA de 96 poços, conforme instruções do fabricante. Uma curva com albumina sérica bovina (BSA, concentrações crescentes de 0 a 0,5mg/mL) foi utilizada como padrão. Após a quantificação, 50 µg de proteína total foram diluídas em 20 µL da solução de corrida (Tris-HCl 260 mM pH 6,8, glicerol 50 %, SDS 10 %, azul de bromofenol 0,5 % e 0,05 % de β-mercaptoetanol diluídos em água Milli-Q) e submetidas à eletroforese em gel poliacrilamida, após fervura por 5 min para desnaturação das proteínas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45mm, utilizando-se cuba de transferência (Bio-Rad). As membranas foram, então, incubadas com 3 % leite em pó desnatado diluído em tampão TBS-T (0,05 M TRIS, 0,1M NaCl, pH 7,6) contendo 0,1 % Tween 20, sob agitação de 50 rpm por 1 hora, a temperatura ambiente, para o bloqueio de

sítios inespecíficos. Na sequência, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários e mantidos sob rotação a 4ºC, por uma noite. Os anticorpos e suas diluições estão especificados na Tabela 3. Todos os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio utilizada (TBS-T-3 % leite). As membranas foram reutilizadas para incubação com o anticorpo anti-β-actina (Tabela 3), utilizado como controle.

Tabela 3–Lista dos anticorpos e suas respectivas diluições utilizados (*Western Blotting*)

Anticorpo	Empresa	Diluição
anti-Caspase 8 p18	Santa Cruz (sc#6136)	1:300
anti-Caspase 8	Abcam (ab25901)	1:750
anti-β-actina	Sigma-Aldrich)	1:5000
Goat anti-rabbit IgG H&L - Horseradish peroxidase	Abcam (ab#6721)	1:1000
Donkey anti-mouse IgG H&L – Horseradish peroxidase	Jackson Immuno Research (#715035151)	1:1000

4.10 Inibindo a caspase-8

Células labirínticas isoladas a partir de placentas de 9,5 dias de gestação foram cultivadas e tratadas com o inibidor de caspase-8 - z-IETD-fmk (#**ab141382** Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 24 e 48 horas.

Neste procedimento, as células isoladas foram inicialmente cultivadas por 6horas em meio D-MEM suplementado com 20 % SBF, a 37°C e em atmosfera úmida com 5 % CO_2. Após esse período, as células receberam meio de cultura fresco contendo o inibidor farmacológico de caspase-8 (z-IETD-fmk diluído em DMSO) e utilizado nas concentrações de 50 e 100 µM no meio D-MEM suplementado com 10 % SBF, durante 40 minutos. Após este período, o meio foi substituído por D-MEM suplementado com 20 % SBF. Após 24 e 48horas, as culturas foram lavadas e processadas para caracterização morfológica (microscopia de luz e imunohistoquímica), ensaio de viabilidade, extração de RNA e *Western Blotting*. As culturas controle receberam meio D-MEM suplementado com 10 % de SBF e DMSO (Merck Millipore) na mesma diluição do inibidor.

4.11 Análise Estatística

As bandas obtidas pela técnica de *Western Blotting* e RT-PCR foram densitometricamente quantificadas utilizando-se o *software* Image J 1.4 (NIH, EUA). Os valores obtidos para as amostras dos diferentes dias gestacionais foram comparados empregando-se o teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey,

utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Foram considerados diferencialmente significativos valores com $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Imunolocalização de marcadores de células progenitoras e sinciciais labirínticas durante o desenvolvimento placentário

Nos espécimes de dia 8,5 de gestação, foi possível observar as duas cavidades embrionárias, o exoceloma e a cavidade amniótica (Figura 9A); a terceira, a cavidade, do cone ectoplacentário, estava obliterada e apenas uma pequena fenda entre a base desta estrutura e o ectoderma extraembrionário pode ser observada (Figuras 9B-C). Revestindo internamente a camada ectodérmica encontrava-se o mesoderma extraembrionário formando o cório ou placa coriônica (Figuras 9B-D). Em muitas amostras observou-se também a inserção do mesoderma alantoideano (Figuras 9A, 9C). O cone ectoplacentário mantinha contato com a decídua mesometrial por meio de uma camada de células gigantes secundárias parietais, que também se estendiam ao redor de todo o embrião (Figura 9D).

Nessa fase da gestação, a imunolocalização de EpCAM, marcador de células-tronco labirínticas, mostrou células coradas exclusivamente na região da placa coriônica (Figuras 9E-H). Nas reações controle em que o anticorpo primário foi omitido não se observou reatividade (Figura 9E). Também não se observou reatividade ao anticorpo anti-Slc16A3 nesta fase da gestação (dados não mostrados).

No dia 9,5 de gestação, capilares sanguíneos fetais com hemácias nucleadas em seu interior estavam presentes no mesoderma alantoideano (Figuras 10A-C). A placa coriônica mostrou-se sinuosa deixando espaços que eram preenchidos por um mesoderma vascularizado (Figura 10A). Ocasionalmente, uma membrana interhemal típica entre o sangue materno e os capilares fetais foi observada. Regiões similares mostraram-se reativas ao marcador Slc16A3 (Figuras 10F-G) ao redor da qual, células EpCAM positivas eram observadas (Figuras 10D-E).

Uma camada mesodérmica mais espessa e com dobras muito mais proeminentes (Figuras 11A-B) é observada no dia 10,5 de gestação. Em relação ao dia 8,5 de gestação, houve um acentuado crescimento nas regiões em que está se formando o labirinto e a zona juncional com células gigantes (em contato com a decídua mesometrial) e células do espongiotrofoblasto (Figuras 11A, 11C). Na região basal observam-se aglomerados celulares que se organizam em cordões a medida que se distanciam em direção à decídua (Figura 11B). Capilares com hemácias nucleadas

são observados no mesoderma entre estes aglomerados celulares. Canais revestidos por trofoblasto já contém sangue materno (Figuras 11D-E). Assim como no dia 9,5 de gestação, a imunolocalização de EpCAM foi observada principalmente nas células da região da placa coriônica, (Figuras 11D-E), enquanto que a marcação para o transportador Slc16A3, foi encontrado nas camadas sinciciais maduras do labirinto (Figuras 11F-G).

No dia 11,5 de gestação, a placenta apresentou dimensões maiores, com sua região labiríntica muito mais desenvolvida e com maiores extensões de áreas interhemais. A placenta nesta fase se assemelha a uma placenta madura. A barreira placentária claramente separa canais com sangue materno (extravasado) e fetal (vasos fetais). Células trofoblásticas gigantes são encontradas região de contato com o sangue materno (Figura 11C).

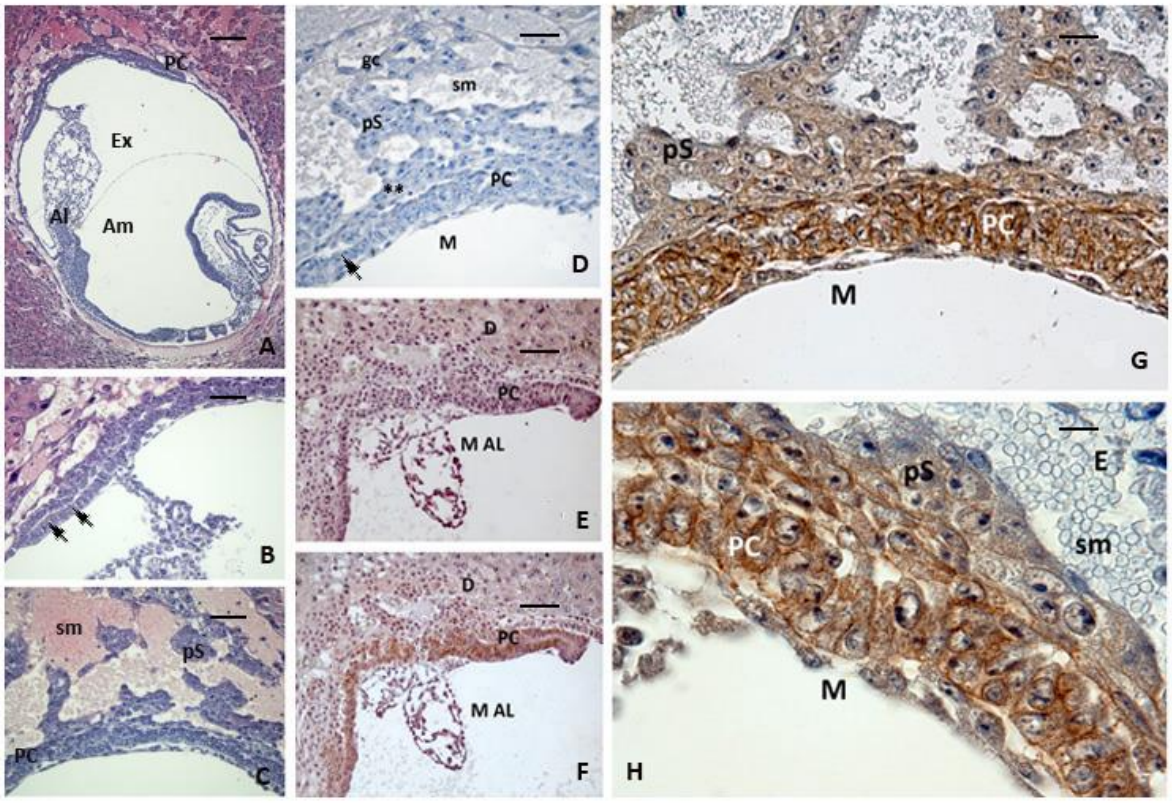

Figura 9. Sítios de implantação, dia 8,5 de gestação. **(A-C)** Sítios de implantação corados pela HE. (**E-H**) Imunolocalização de EpCAM (imunoperoxidase com contracoloração pela Hematoxilina de Mayer). (**A**) Notar a presença das cavidades amniótica (Am) e exocelômica (Ex). O alantoide (AL) já atingiu o ectoderma extraembrionário na placa coriônica (PC). (**B-D**) Região em formação do espongiotrofoblasto (pS) por entre os quais encontra-se sangue materno extravasado (sm). Nas figuras **B** e **D** é possível observar a estreita aproximação (setas) do cório (PC) à camada basal do cone ectoplacentário (**). (**E-H**) Imunoreatividade ao EpCAM na região da placa coriônica (PC). (**E**)Controle da reação imunohistoquímica, em que o anticorpo primário foi omitido. M AL, mesoderma

alantoideano; M, mesoderma; D, decídua mesometrial. Barra = 750 µm em **A**, 200 µm em **B**, 150 µm em **C-D**, 450 µm em **E-F**, 80 µm em **G** e, 40 µm em **H**.

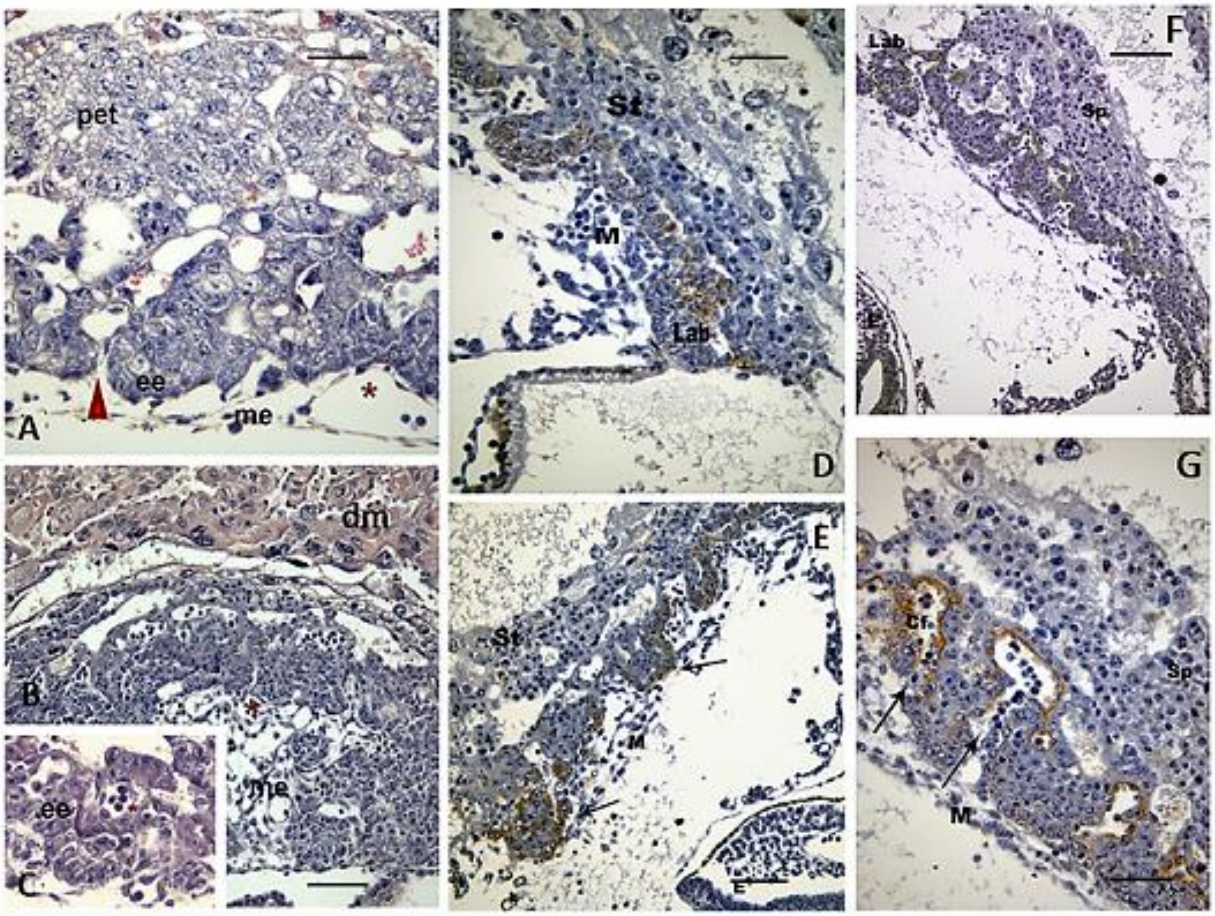

Figura 10. Sítio de implantação aos 9,5 dias de gestação. (**A**) Notar o mesoderma (me) vascularizado adentrando a placa coriônica e a base do cone ectoplacentário (cabeça de setas). Notar que esses vasos fetais (*) já contem hemácias nucleadas (detalhe em **C**). (**D-E**) Notar a presença de nichos de células indiferenciadas ao redor do mesênquima, EpCAM reativos (coloração marrom, setas, **E**). A camada de sinciciotrofoblasto (III)mantém contato com capilares fetais (Cf) em formação (setas, **G**) e é identificada por meio da imunolocalização de Slc16A3 (**F-G**). dm, decídua mesometrial; ee, ectoderma extraembrionário, pet, pré-espongiotrofoblasto; St, espongiotrofoblasto, M e me; mesoderma alantoideano; Lab, labirinto. HE. Barra= 80µm em **A**,180 µm em **B, D-E** e **G**, 40 µm em **C** e, 200 µm em **F**.

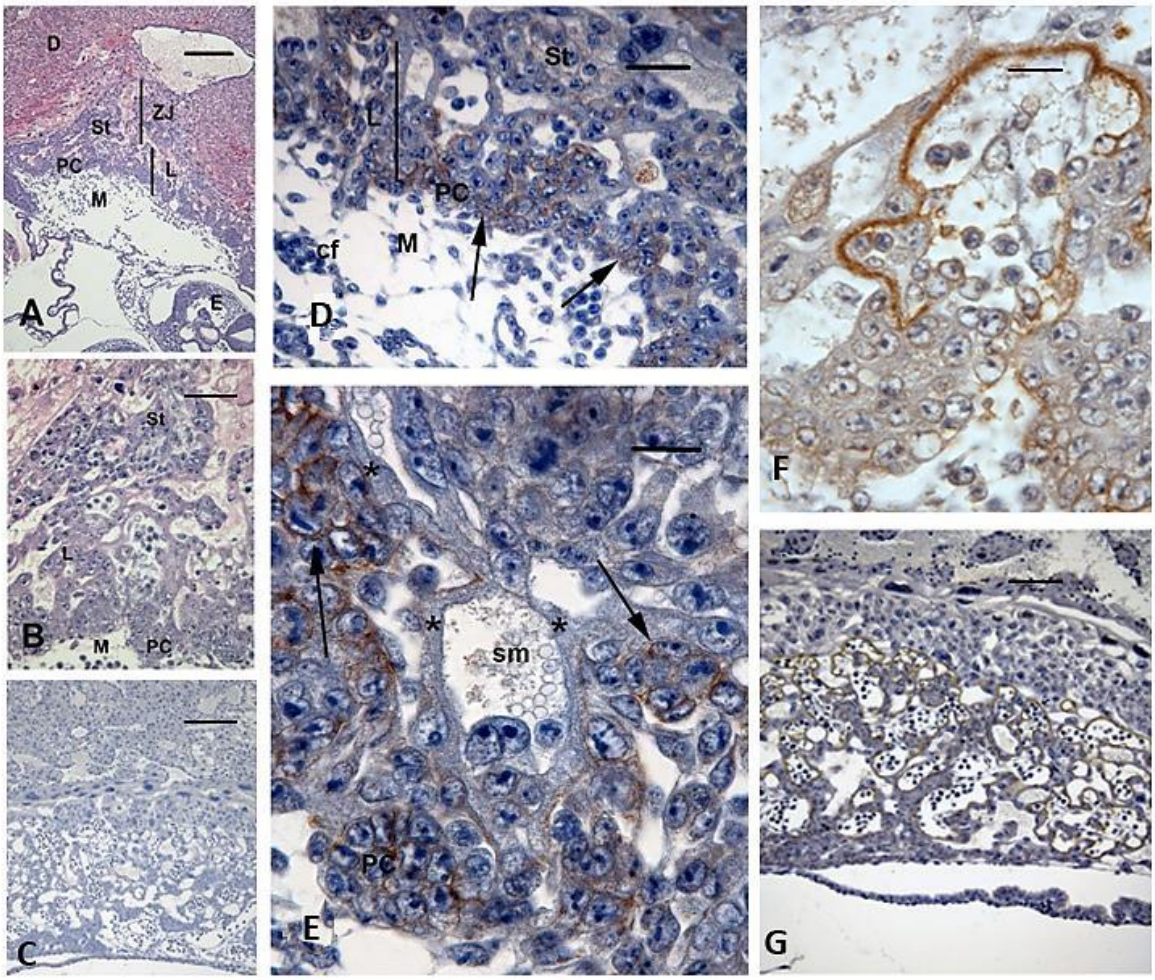

Figura 11. Sítios de implantação, dia 10,5 de gestação. (**A-B**) Sítios de implantação corados pela HE aonde estão indicadas a região labiríntica (L) e a juncional (ZJ) contendo o espongiotrofoblasto (St). (**B**)Notar a presença da placa coriônica (PC) com aglomerados celulares que se estendem em delicadas áreas colunas de membranas interhemais e que se continuam com as células do espongiotrofoblasto (St). (**D-E**) Reatividade ao EpCAM (setas) é observada nas células da placa coriônica (PC) e nos aglomerados celulares, mas não nas regiões em que a membrana interhemal já se formou (*). (**F-G**) A reatividade ao anticorpo anti-Slc16A3 é observada no labirinto, nas áreas em que a membrana interhemal está formada (**F**, corada em marrom). (**C**) Controle da reação imunohistoquímica, em que o anticorpo primário foi omitido. M, mesoderma; D, decídua mesometrial; cf, capilar fetal; sm, sangue materno. Barra= 400µm em **A**, 160 µm em **B**, 200 µm em **C**,80 µm em **D**, 40 µm em **E-F** e,140 µm em **G**.

5.2 Expressão gênica dos marcadores de diferenciação sincicial

A expressão gênica de marcadores de diferenciação específicos das células que compõe o labirinto foi investigada por RT-PCR em amostras obtidas conforme descrito no item 4.2 e 4.3 da sessão de Material e Métodos. Foram investigadas as expressões de *Gcm1* (expresso em células coriônicas que dão origem ao sinciciotrofoblasto III), *Dlx3* (fator homeobox que funciona como um fator regulador de transcrição restrito ao sinciciotrofoblasto), *Sincitina A* (expresso especificamente

na camada de sinciciotrofoblasto II) e *Sincitina B* (expressão restrita a camada de sinciciotrofoblasto III). Como normatizador utilizou-se o gene *Ywhaz*.

Todos os marcadores mostraram-se expressos na região labiríntica de camundongos no período analisado (Figura 12). Entretanto, houve diferenças de expressão nos dias analisados em relação ao dia 8,5 de gestação.

Níveis gradativamente maiores foram observados na expressão de *Dlx3, Gcm1* (Figura 12A, p<0,05) e *Sincitina A* e *B* (Figuras 12B) em relação ao dia 8,5 de gestação nos dias 9,5 e 10,5 de gestação (p<0,05).

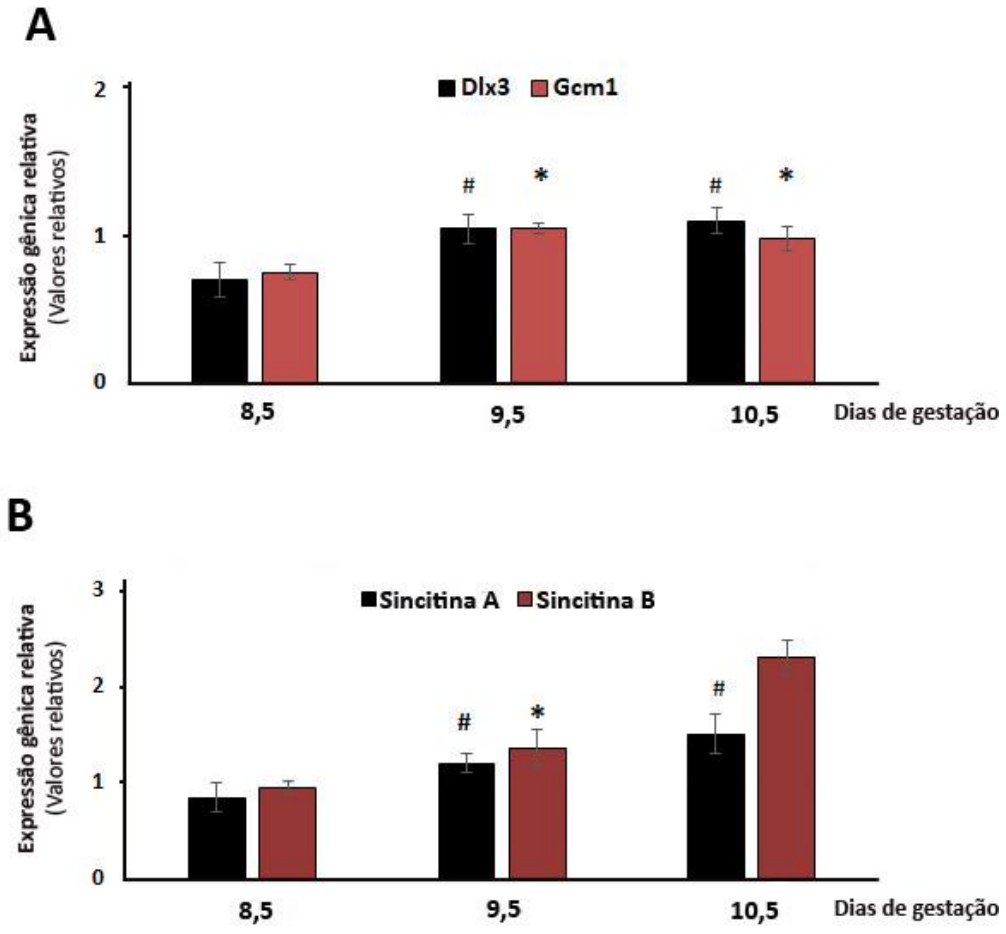

Figura 12. Expressão gênica dos fatores *Dlx3 e Gcm1* (*A*) *e, Sincitina A e B* (**B**) na região pré-labiríntica e labiríntica da placenta de camundongos de 8,5 a 10,5 dias de gestação. A análise densitométrica foi normatizada em função do gene *housekeeping Ywhaz*. Valores médios ± DP; ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. #,*p<0,05 em relação ao dia 8,5 de gestação.

5.3 Expressão de Caspase-8 durante o período de diferenciação labiríntica

A expressão protéica de Pró-Caspase-8 e Caspase-8 ativada também foi avaliada nas amostras extraídas das regiões pré-labirínticas/labirínticas dos dias 8,5 a 10,5 de gestação (Figuras 13).A análise densitométrica das bandas protéicas obtidas nos géis de poliacrilamida normatizadas pela β-actina mostrou níveis aumentados da forma clivada da Caspase-8 ($p<0,05$) nos dias 9,5 e 10,5 em relação ao dia 8,5 de gestação, embora com uma queda significativa no dia 10,5 de gestação em relação ao dia 10,5 ($p<0,05$). A relação entre a forma clivada/proforma também mostrou-se aumentada nos dias 9,5 e 10,5 de gestação em relação ao dia 8,5 de gestação ($p<0,05$).

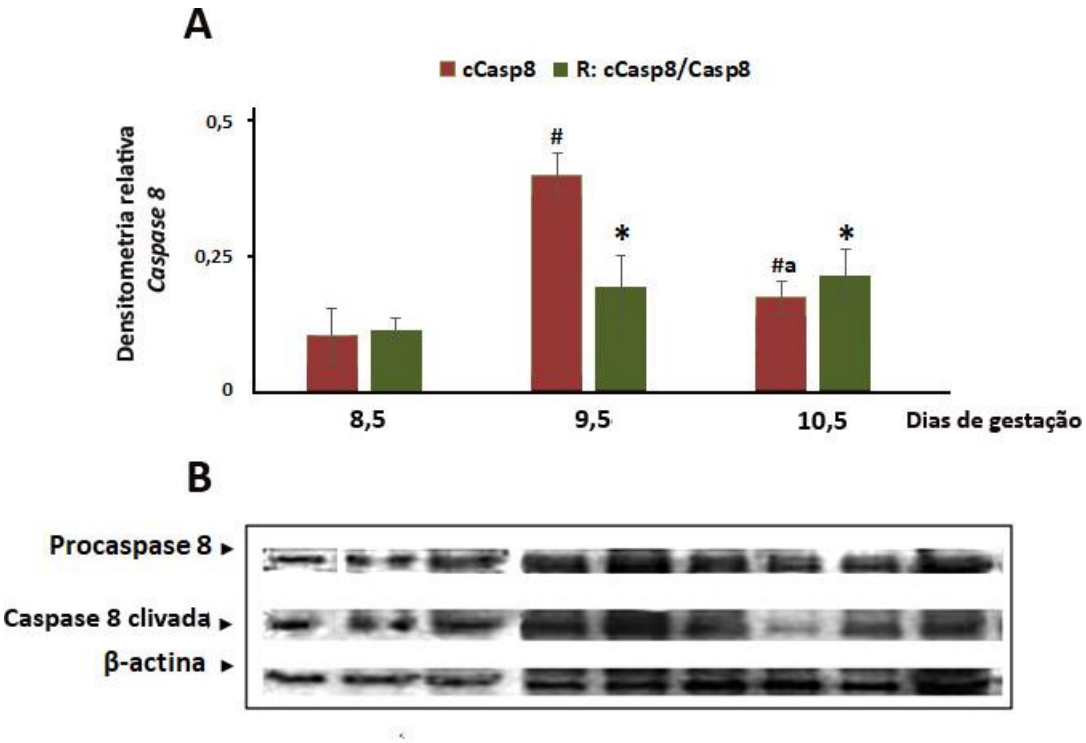

Figura 13. Expressão de Caspase-8 durante o desenvolvimento do labirinto. Análise por *Western blotting*. O histograma (**A**) representa os valores médios (± desvio padrão) das análises densitométricas das bandas protéicas de Caspase-8 clivada/β-actina e da relação Caspase-8 clivada/Caspase-8 total nos diferentes dias de gestação. [#,]***p<0,01 em relação ao dia 8,5 de gestação respectivamente para Caspase clivada e para a relação Caspase clivada/Caspase total; [#a]p<0,05 em relação ao dia 9,5 de gestação. (**B**) Bandas representativas de um experimento identificando pró-Caspase-8 (PM: 56kDa), sua forma clivada (PM: 18 kDa) e β-actina (PM 42 kDa).

5.4 Morte celular programada por apoptose na região de morfogênese labiríntica

Exceto por eventuais células no sítio de implantação, não houve reatividade para M30 nas células trofoblásticas da placenta em formação nos dias 8,5, 9,5, 10,5 e 11,5 de gestação. Imagem representativa destas reações imunohistoquímicas estão mostradas nas Figuras 14A-B.

A avaliação de células em processo de morte celular também foi realizada pela reação de TUNEL. Apenas células deciduais próximas às células trofoblásticas gigantes da zona juncional foram observadas com reatividade ao TUNEL (Figura 14D).

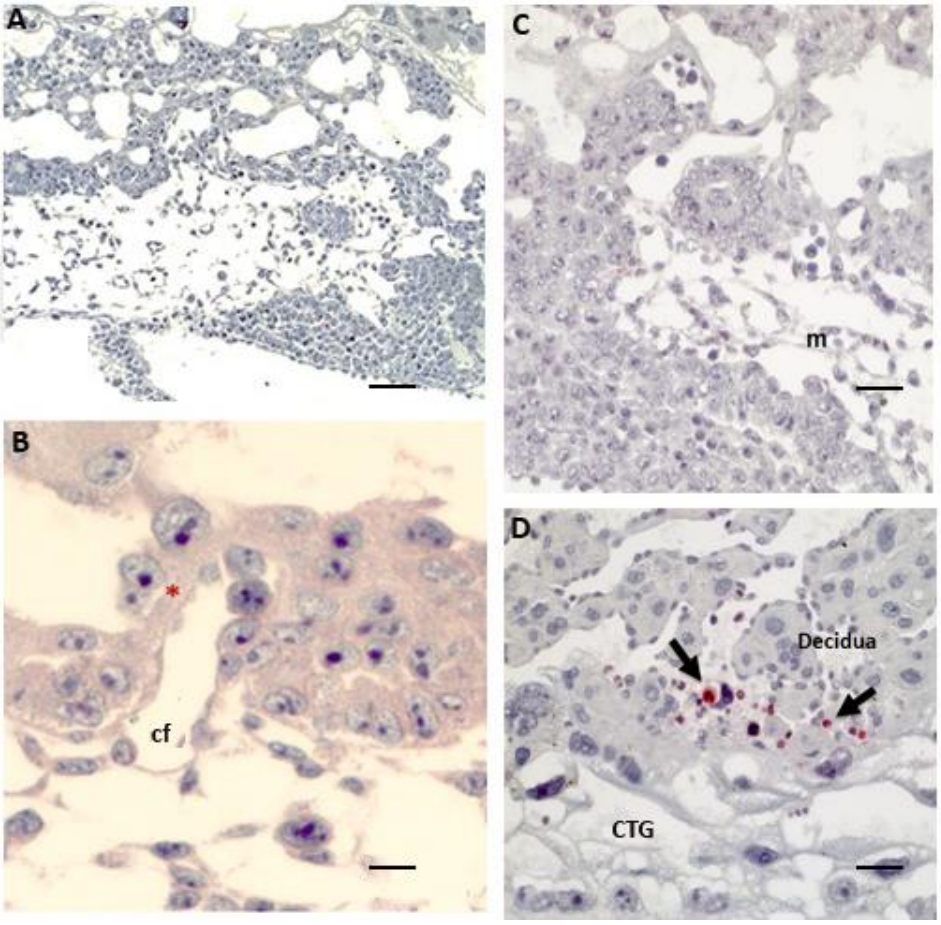

Figura 14. Imunolocalização de Citoqueratina 18 clivada e reação de TUNEL para a identificação de células em apoptose. (**B**) Imagem representativa da imunolocalização de epítopos de Citoqueratina clivada por caspase (M30) na região do labirinto em formação, no dia 9,5 de gestação (imunofosfatase com contracoloração pela Hematoxilina de Harris). (**D**) Reação de TUNEL no sítio de implantação aos 9,5 dias de gestação. Notar a ausência de marcação na região do labirinto em formação e células reativas apenas na região da decídua mesometrial (imunofosfatase alcalina identificada pela coloração rosa, setas). (**A, C**) Controle das reações de imunohistoquímica e de TUNEL respectivamente, em que o anticorpo primário foi omitido da reação. m, mesênquima; cf,

capilar fetal; *sinciciotrofoblasto em formação; CTG, células trofoblásticas gigantes. Barra= 160 µm (**A**), 30 µm (**B**), 80 µm (**C**), 60 µm (**D**).

5.5 Caracterização morfológica das culturas de células labirínticas

O isolamento das células labirínticas foi feito a partir de placentas de dias 8,5 a 10,5 de gestação. Essas células foram cultivadas por 24 e 48 horas sobre lamínulas e processadas para a imunolocalização do marcador de trofoblasto – Citoqueratina 8/18 (TROMA), células endoteliais, CD31, do marcador morfogenético EpCAM e de diferenciação Slc16A3. Além disso, foi realizado ensaio de viabilidade por Azul de Tripan e estabelecida curva de crescimento das culturas, como descrito no item 4.5 do item de Material e Métodos.

Após 24 e 48h, as células cultivadas a partir das regiões pré-labirínticas de dia 8,5 de gestação não apresentaram indícios proeminentes de sincicialização. A grande maioria das células se mantinha isoladas umas das outras, poucas mantinham proximidade que pudesse sugerir sincicialização. Por não gerarem massas sinciciais ou mesmo interações que pudessem levar a essas formações no período estudado, estas culturas não foram utilizadas nos experimentos que se seguiram.

As células cultivadas a partir de regiões da placa coriônica e labiríntica do dia 9,5 de gestação apresentaram perfil diferenciado em relação à cultura do dia de células obtidas aos 8,5 dias de gestação. Estas culturas que após 6 horas mostravam células individualizadas passavam a se organizar como uma monocamada (geralmente descontínua), de aspecto rendilhado, devido ao contato entre célula vizinhas (Figuras 15A-C). Caracteristicamente, aglomerados celulares também eram encontrados e foram mais numerosos após 48h de cultivo (Figura 15C). Estes aglomerados arranjados em forma de ninhos abrigavam massas celulares sem limites nítidos na região central e células individualizadas, em arranjo epitelial circunscrevendo as massas centrais (Figura 15D). Frequentemente, algumas destas células individualizadas exibiam grandes dimensões, lembrando células gigantes placentárias. As massas centrais apresentavam número variado de núcleos (5 a 50) e sob análise ao microscópio de luz, assemelhavam-se a massas sinciciais. Estas culturas mostram-se promissoras quanto à formação de células sinciciais e foram caracterizadas morfológica e molecularmente.

As células placentárias isoladas a partir do dia 10,5 de gestação apresentavam morfologia semelhante à observada nas culturas de dia amostras obtidas no dia 9,5 de gestação. Entretanto, após 48h de cultivo, o crescimento celular assumia proporções maiores, com sobreposição celular, tornando difícil a análise morfológica de forma detalhada, das células cultivadas. Desta forma, assim como as culturas de amostras obtidas no dia 8,5 de gestação, estas culturas não foram submetidas a análises adicionais.

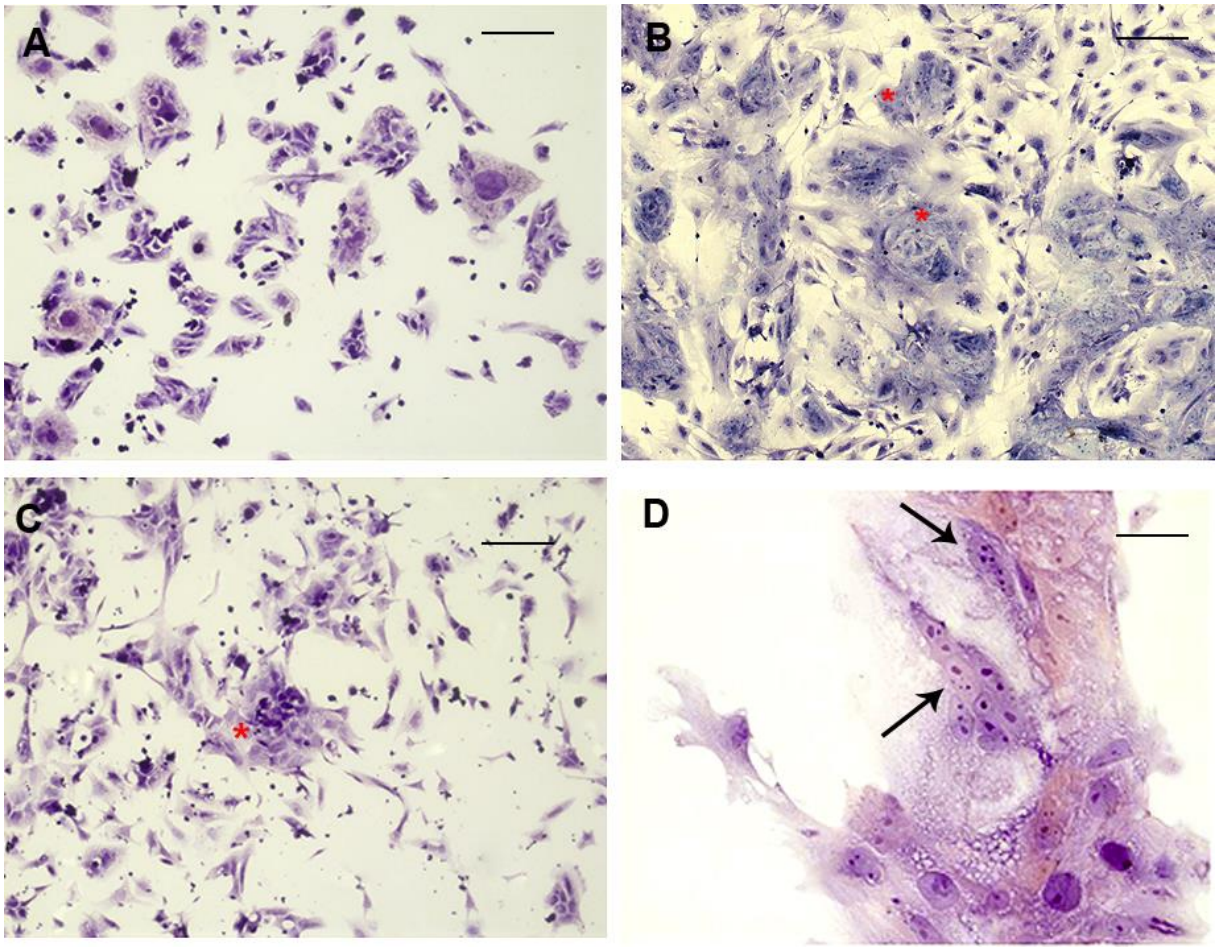

Figura 15. Cultura de células obtidas da região labiríntica aos 9,5 dias de gestação. (**A**): Tempo de cultivo = 6 horas após (ponto zero). (**B-C**): Tempo de cultivo = 24horas (**C**) e 48 horas (**B**). Notar a formação de aglomerados celulares (asterisco) e aparente interação célula-célula, em detalhe no quadro **D**. (**D**) Em um ninho de células cultivadas, as setas possivelmente apontam a formação de um sincício. Barra= 240 µm (**A-C**); 40 µm (**D**).

As culturas de células obtidas aos 9,5 dias de gestação mostraram-se prevalentemente reativas ao anticorpo anti Citoqueratina 8/18, indicando sua origem trofoblástica (Figura 16A-C). Células reativas ao anticorpo anti-CD31, marcador de células endoteliais, também foram encontradas nessas culturas (Figuras 16D-E), particularmente em células de pequenas dimensões e fusiformes que se localizavam

entre os ninhos celulares. Controles negativos da reação não mostraram qualquer reatividade (Figura 16F).

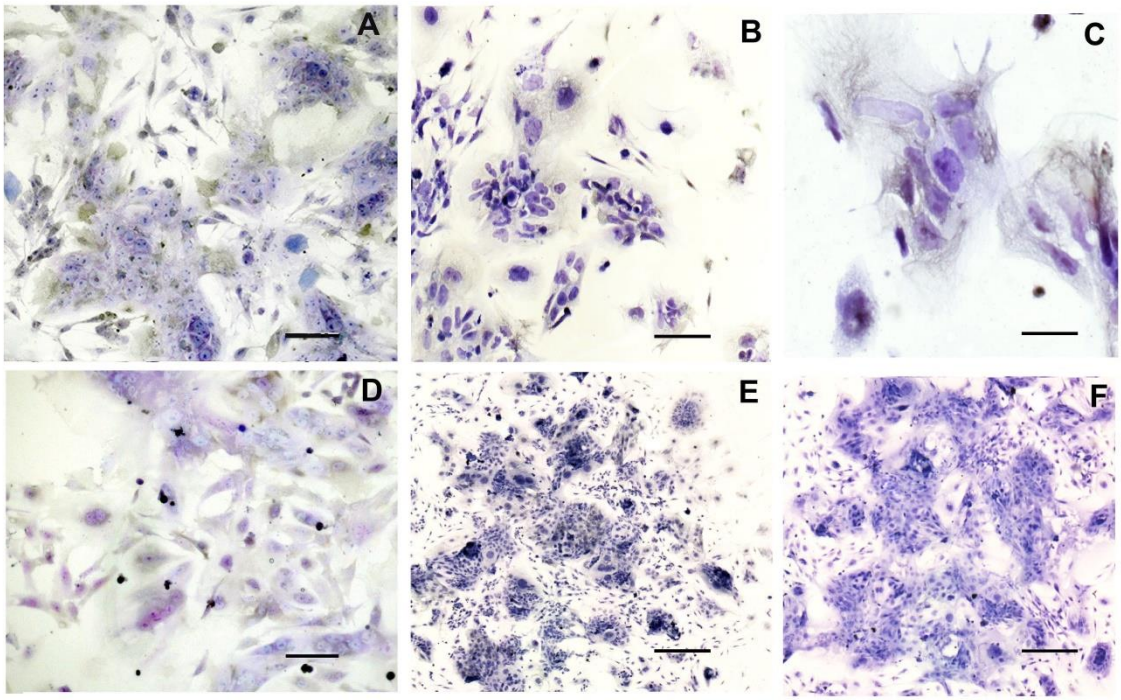

Figura 16. Caracterização das culturas de células placentárias obtidas no dia 9,5 de gestação. (**A-C**) Imunomarcação para Citoqueratina 8/18 (TROMA), em células cultivadas por 6 horas(A) e 24 horas (**B-C**). (**D-E**) Células imunorreativas para CD31, em culturas de 6 horas(**D**) e 48horas (**E**). A reatividade está representada por coloração acastanhada. (**F**) Controle negativo, em que o anticorpo primário anti citoqueratina foi omitido da reação. Imunoperoxidase com contracoloração com Hematoxilina de Harris. Barra=180 µm (**A**); 120 µm (**B, D**); 40 µm (**C**); 200 µm (**E-F**).

Uma grande parte das células isoladas a partir da região labiríntica no dia 9,5 de gestação apresentaram-se imunorreativas para EpCAM nas culturas de 6horas (Figura 17A). Após 24 e 48 horas de cultivo, a imunomarcação foi detectada principalmente na região periférica dos ninhos celulares (Figuras 17B-D). Ao contrário, a imunoreatividade para o marcador Slc16A3 (Figuras 17E-H), foi muito discreta nas primeiras 6 horas de cultivo, aumentando progressivamente nas culturas de 24 e 48 horas. As células reativas ocupavam a porção central dos nichos celulares (Figura 17H).

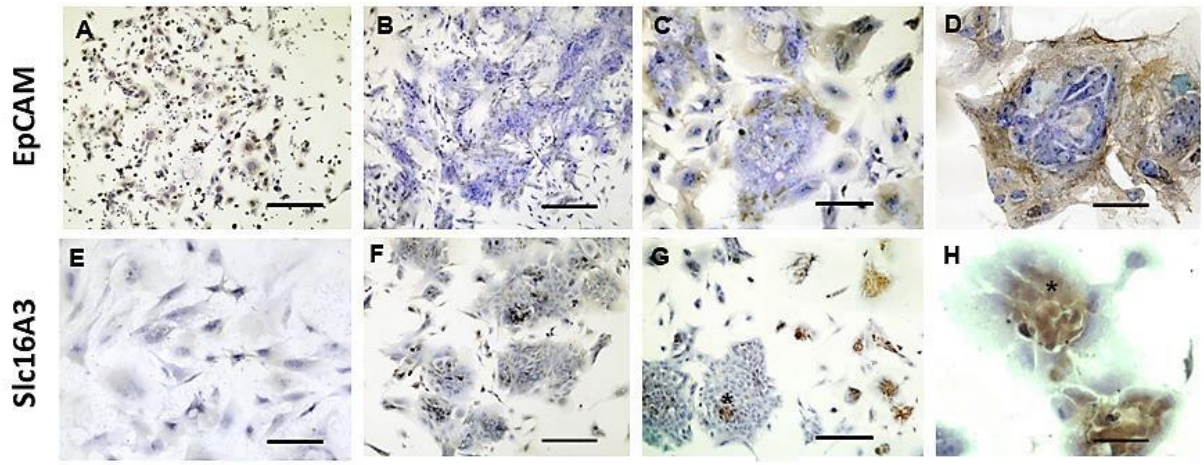

Figura 17. Imunolocalização de marcadores trofoblásticos em células cultivadas, obtidas no dia 9,5 de gestação. As reações estão identificadas pela coloração acastanhada. **A-D**: Imunolocalização do marcador de células progenitoras do labirinto, EpCAM em células cultivadas por 6 h (**A**) e 48 h (**B-D**). **E-H**: Imunolocalização do transportador sincicial Slc16A3 após 6 h (**E**) e 48h (**F-H**) de cultivo. Imunoperoxidase com contracoloração com Hematoxilina de Harris. (*) ninhos celulares, células centrais. Barra = 200 µm (**A-B**); 100 µm (**C, E, G**); 120 µm (**F**); 40 µm (**D; H**).

5.6 Expressão gênica de marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas

Por meio da técnica de RT-PCR, foi determinada a expressão de alguns dos marcadores de diferenciação específicos das células que compõe o labirinto, ao longo do período de cultivo de células obtidas aos 8,5, 9,5 e 10,5 de gestação. Foram investigadas as expressões de *EpCAM*, *Sincitina A* e *Sincitina B*. Como fator de normalização utilizou-se o gene *Ywhaz* (Figura 18).

Todos os marcadores mostraram-se expressos nas células isoladas após cultivo por 24 e 48 horas. A *Sincitina A* (Figura 18A) mostrou níveis menores de expressão nas culturas de células obtidas no dia 8,5 de gestação, ao longo de todo o período de cultivo. Células cultivadas obtidas no dia 9,5 de gestação mostraram níveis significativamente mais altos de expressão em relação ao dia 8,5 de gestação e em relação ao tempo de cultivo ($p<0,05$, Figura 18A). Células obtidas aos 10,5 dias de gestação exibiram níveis altos de expressão após 6 horas de cultivo, decrescendo significativamente ao longo do tempo de cultivo ($p<0,05$, Figura 18A).

A expressão de *Sincitina B* mostrou níveis aumentados após 48 horas de cultivo das células placentárias obtidas aos 8,5 dias de gestação (Figura 18B). Células obtidas no dia 9,5 de gestação mostraram níveis de expressão aumentados ao longo do tempo de cultivo ($p<0,05$, Figura 18B), enquanto que no dia 10,5 de gestação a

expressão teve um padrão semelhante ao da *Sincitina A:* alta no início do cultivo, decrescendo nos tempos subsequentes (Figura 18B).

A expressão de *EpCAM* aumentou nas culturas de células obtidas aos 8,5 e 9,5 dias de gestação em função do tempo de cultivo de 24 e 48 h (p<0,05, Figura 18C). A expressão das células de 10,5 dias de gestação por outro lado, foi alta no início do cultivo, diminuindo relevantemente ao longo dos períodos subsequentes (p<0,05, Figura 18C).

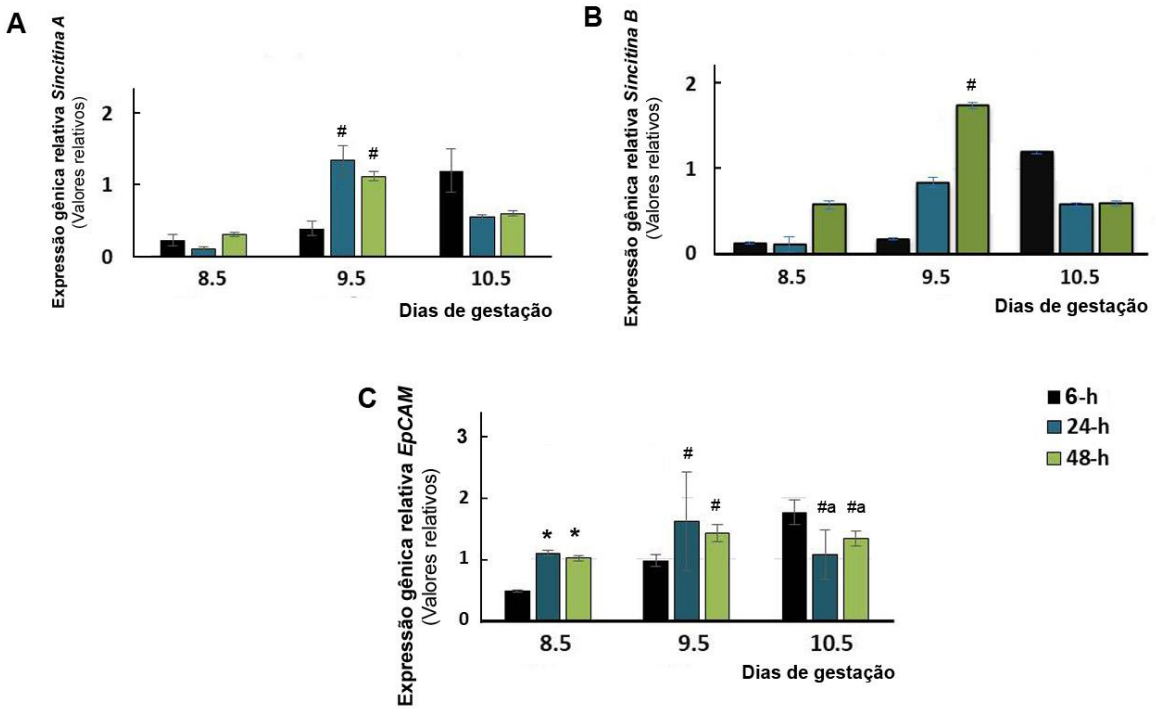

Figura 18. Expressão gênica de marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas obtidas em diferentes dias gestacionais. Gráfico das expressões gênicas relativas de *Sincitina A*, *Sincitina B* e *EpCAM* em culturas de 24 e 48 horas (**A, B** e **C**, respectivamente). As células labirínticas foram isoladas nos dias 8,5, 9,5 e 10,5 de gestação. Valores médios ± DP; ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05 em relação ao dia 8,5 de gestação, cultivo de 6 horas; #p<0,05, em relação ao dia 9,5 de gestação, cultivo de 6 horas; $^{\#a}$p<0,05 em relação ao dia 10,5 de gestação, cultivo de 6 horas.

5.7 Bloqueio da clivagem de Caspase-8 com o inibidor z-IEDT-fmk nas células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação

A partir das caracterizações morfológica e gênica, o dia 9,5 de gestação foi o escolhido para análise e tratamento com o inibidor de Caspase-8, z-IEDT-fmk. A eficiência do tratamento no bloqueio da expressão de Caspase-8 clivada nas células cultivadas foi analisada por meio da expressão proteica da Pró-Caspase-8 e da Caspase-8 clivada (Figura 19A). A análise densitométrica mostrou que a expressão

de Pró-Caspase-8 não sofreu influência do inibidor, mesmo com a utilização do bloqueador em diferentes concentrações (Figura 19B). Com a concentração de 50 µM, houve aumento significativo na expressão de Caspase-8 total e diminuição significativa nos níveis de Caspase-8 clivada e na relação Caspase-8 clivada:Caspase-8 total, nas culturas de 24 e 48 horas. Na concentração de 100 µM, o bloqueio foi muito mais intenso; não se detectou caspase clivada nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 19A).

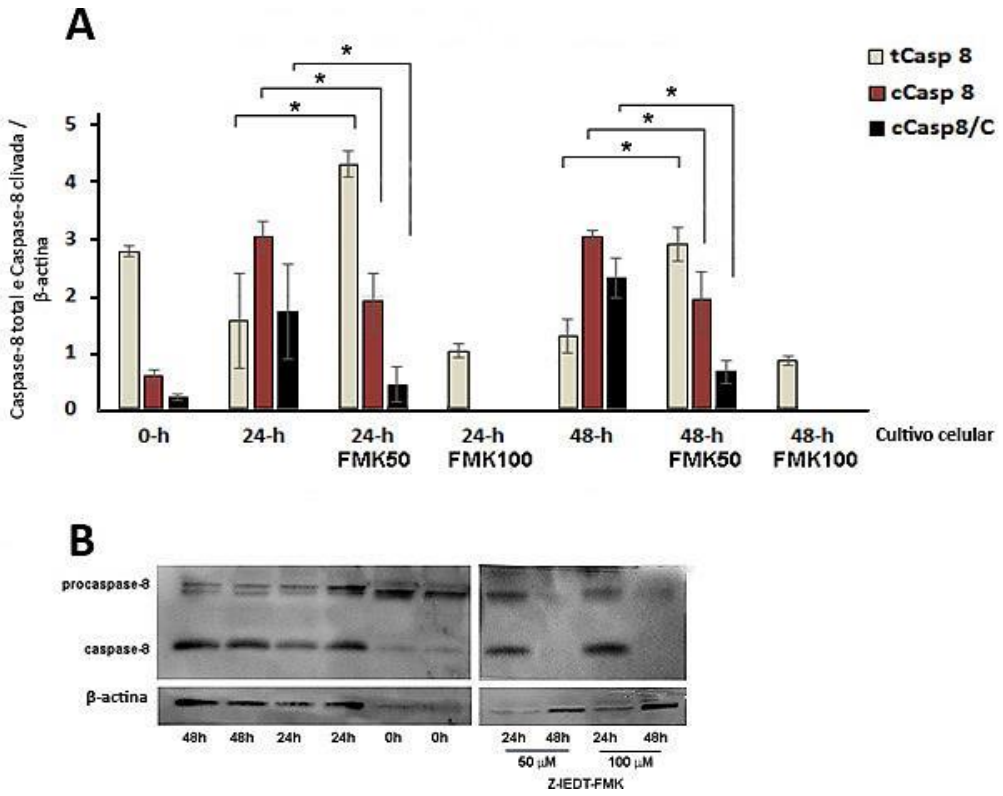

Figura 19. Expressão de Caspase-8 em células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação e cultivadas por 24 e 48 horas após o tratamento com z-IETD-fmk. (**A**) Quantificação densitométrica relativa de Caspase-8 expressa como a relação entre as proteínas total e clivada/β-actina nos diferentes pontos experimentais de cultivo. As barras claras indicam os níveis de Caspase total, as barras vermelhas os níveis de Caspase clivada e as pretas a relação entre Caspase-8 clivada/Caspase-8 total. Os resultados estão mostrados como média ± desvio padrão (n = 2). ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, *p< 0.05. (**B**) *Western blot* representativo de dois independentes experimentos, refletindo os níveis protéicos de Caspase-8. As bandas da proforma da Caspase-8 (56 kDa) e de sua forma clivada (18 kDa), assim como da β-actina (42 kDa) aparecem identificadas na figura.

5.8 Caracterização morfológica das culturas de células labirínticas obtidas no dia 9,5 de gestação tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk

As culturas de células labirínticas também foram analisadas após o bloqueio da Caspase-8 clivada. Células obtidas no dia 9,5 de gestação tratadas com inibidor z-

IETD-fmk foram cultivadas por 24 e 48 horas e submetidas à imunolocalização de EpCAM e Slc16A3.

A presença do inibidor z-IETD-fmk alterou profundamente a morfologia das células labirínticas cultivadas. O típico perfil em ninhos das células cultivadas por 48 horas (Figura 20A) não foi observado nas culturas tratadas (Figura 20B). Nestas, as células se mantinham espaçadas umas das outras, sem a formação de nichos ou aglomerados celulares (Figura 20B). Além disso, apresentaram fraca marcação para EpCAM (Figura 20C-D) e para Slc16A3, após 24 e 48 horas de cultivo (Figura 20E).

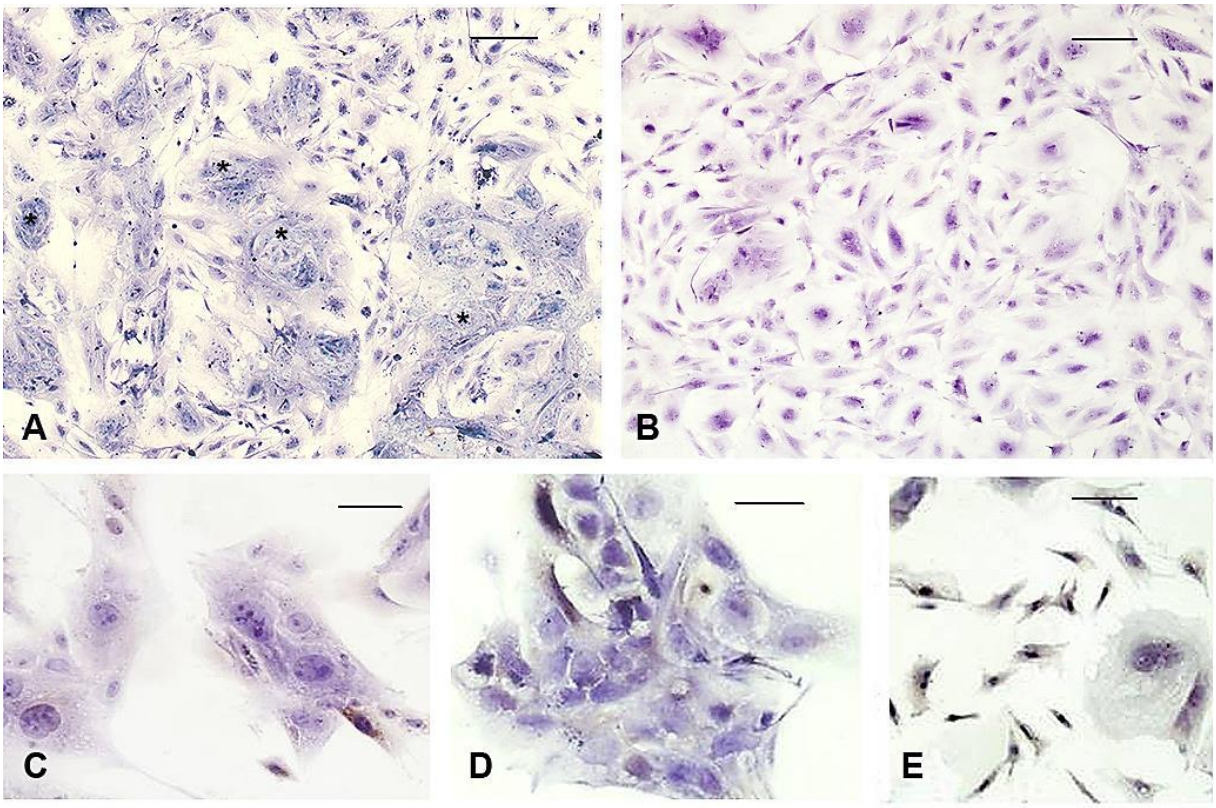

Figura 20. Imunolocalização de marcadores de diferenciação em células labirínticas obtidas aos 9,5 dias de gestação tratadas com z-IETD-fmk. (**A**) Culturas controle – células cultivadas por 48horas sem inibidor. Notar a típica formação em ninhos (*). (**B**) Culturas tratadas com z-IETD-fmk – Observar que estas células não se organizam em ninhos como as células da cultura controle. (**C-D)**: Poucas células foram imunorreativas a EpCAM (**C-D**) e a Slc16A3 (**E**) nas culturas tratadas com o inibidor farmacológico. Imunoperoxidase (identificada pela coloração acastanhada), contracoloração com Hematoxilina de Harris. Barra =150 µm (**A-B**); 40 µm (**C-D**); 60 µm (**E**).

5.9 Perfil de expressão gênica dos marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk

A expressão dos marcadores *EpCAM* e *Sincitina A/B* (Figura 21) foi avaliada nas culturas tratadas com o inibidor de Caspase-8, por meio da técnica de RT-PCR.

Os níveis de *Sincitina A* tiveram uma expressiva redução, nas duas concentrações de inibidor, após 24 horas e principalmente após 48 horas de cultivo ($p<0,05$) em relação aos níveis encontrados nas culturas controle. Os níveis gênicos de *Sincitina B* mostraram-se reduzidos em relação ao controle, apenas após 48 horas, nas duas concentrações utilizadas ($p<0,05$). Os níveis de *EpCAM* também apresentaram-se reduzidos com a concentração do inibidor de 50 µM após 48 horas e após 24 e 48 horas com o uso do inibidor na concentração de 100 µM ($p<0,05$).

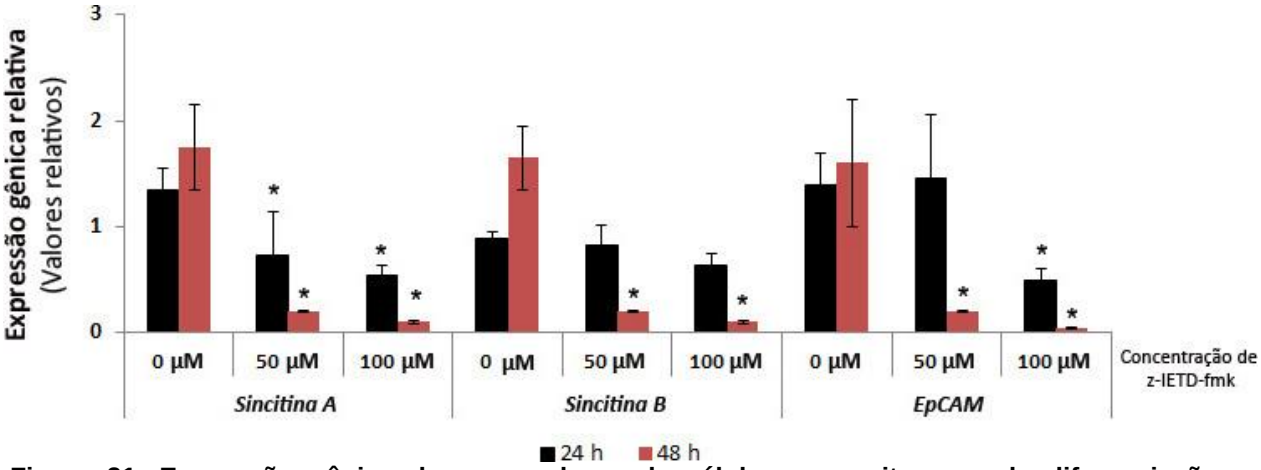

Figura 21. Expressão gênica dos marcadores de células progenitoras e de diferenciação sincicial em culturas de células labirínticas tratadas com o inibidor z-IEDT-fmk. As expressões gênicas relativas de *Sincitina A*, *Sincitina B* e *EpCAM* estão plotadas no gráfico apresentado. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=2). Asteriscos representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) em relação ao respectivo controle temporal (0 µM). ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo analisar a formação das camadas sinciciais do labirinto de camundongos, investigando a possível participação da Caspase-8 nesse processo. Estas camadas são parte integrante da barreira placentária ou interhemal que separa o sangue materno do fetal, especializada no transporte molecular entre esses organismos, uma estrutura chave e imprescindível para o sucesso gestacional.

Baseados em estudos prévios que caracterizaram morfologicamente a barreira placentária em roedores (JOLLIE, 1964; ENDERS, 1965; HERNANDEZ-VERDUN, 1974), o período de análise foi restrito ao período de 8,5 a 11,5 de gestação. A formação da placenta se inicia com a fusão cório-alantoideana no dia 8,5 de gestação, momento em que se desencadeia uma cascata de expressões gênicas que, no cório, induz a diferenciação dos diferentes tipos celulares do labirinto e, no cone ectoplacentário, a zona juncional com as células do espongiotrofoblasto e as células gigantes (ROSSANT; TAM, 2001; revisão WATSON; CROSS, 2005).

A análise morfológica da região envolvida com a formação da camada labiríntica no dia 9,5 de gestação foi coerente com a literatura (HERNANDEZ-VERDUN, 1974; WATSON; CROSS, 2005). Esta região mostrou células de características indiferenciadas agrupadas e separadas por mesênquima vascularizado. Entre estas células, nas regiões voltadas para a decídua, poucas células esboçavam as características da barreira interhemal. Aonde estas características estavam presentes, vasos fetais mantinham estreita proximidade com células organizadas em delgadas membranas, que em suas faces opostas, mantinham contato com o sangue materno extravasado. Nos dias subsequentes estas áreas tornaram-se muito mais abundantes.

A presença de células progenitoras do sinciciotrofoblasto foi avaliada pela expressão de EpCAM (UENO et al., 2013) enquanto que a presença de células diferenciadas com características funcionais de transporte foi determinada pela expressão de Slc16A3 ou MCT4 (NAGAI et al., 2009).

EpCAM é uma proteína transmembrana relacionada a adesão de células epiteliais, que também tem ação na regulação da proliferação de células tumorais (LITVINOV et al., 1994, 1996; SCHON, 1996). Esta proteína tem se mostrado atuante na manutenção do estado de pluripotência de células embrionárias

humanas, pela ligação de um dos produtos resultantes de sua clivagem, o EpICD, a genes promotores da pluripotência, como *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* (LU et al., 2010). Em camundongos, seu gene homólogo (*mEpCAM*), compartilha grande homologia com o gene humano e também se mostrou relevante na manutenção do estado de pluripotência em células-tronco embrionárias (GONZÁLEZ et al., 2009, MCQUALTER et al., 2010), particularmente nas células progenitoras da região do labirinto (UENO et al., 2013).

Em nossas análises, reatividade a EpCAM foi encontrada na placa coriônica indicando a presença de células progenitoras do labirinto nessa região. Nas fases subsequentes a área reativa foi menor, mantendo-se restrita às células da região basal do labirinto, que, morfologicamente se organizam em formas de cordões. Esta restrição pode estar associada a uma diminuição da multipotencialidade dessas células e, a especificação das regiões placentárias. Este achado foi corroborado pela expressão de Slc16A3.

A imunolocalização de células Slc16A3 (ou MCT4) reativas, ao contrário de EpCAM, aumentou ao longo do período estudado. Slc16A3 é um transportador bidirecional de membrana para lactato, corpos cetônicos e outros monocarboxilatos presente na membrana celular basal da camada de sinciciotrofoblasto III diferenciada e funcionalmente ativa da placenta de roedores (NAGAI et al., 2009). Esse transportador também tem um papel preponderante na polarização das membranas celulares sinciciais e mantem relação com o transportador GLUT1 de glicose (NAGAI et al., 2009). Temporalmente nossos achados não corroboram os de Nagai et al. (2009), que não detectou a expressão de Slc16A3 em placentas de camundongos no dia 9,5 de gestação, apenas a partir do dia 10,5 de gestação. Entretanto, deve ser ressaltado que a reatividade por nós encontrada nessa fase foi restrita a poucas áreas. Além disso, é sabido que diferentes linhagens de roedores utilizadas apresentam diferenças temporais no desenvolvimento.

O aumento da expressão de Slc16A3 nos dias 10,5 e 11,5 de gestação se relacionaram com a evolução da camada labiríntica e formação da barreira interhemal observada morfologicamente. Estes achados foram, de certa forma, corroborados pela expressão de marcadores gênicos específicos para cada população celular presente no labirinto.

A expressão de *Gcm1* é decisiva para o processo de sincicialização. Sua expressão inicia-se precocemente no dia 8 de gestação em células coriônicas localizadas nas áreas aonde ocorre a invaginação do mesoderma alantoideano e sua interação com o ectoderma extraembrionário (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000; ROSSANT; CROSS, 2001). Após a fusão cório-alantoideana, a expressão de *Gcm1* se torna restrita a células coriônicas em contato com o mesoderma alantoideano, região em que se inicia o processo de sincicialização trofoblástica (ROSSANT; CROSS, 2001). A expressão de *Gcm1* é uma condição crucial para a expressão de outro fator relevante para a formação sincicial, a *Sincitina B* (SIMMONS et al., 2008; HENKE et al., 2013), característica do sinciciotrofoblasto III (DUPRESSOIR et al., 2005, 2009).

Em nossas análises observamos que há um aumento na expressão de *Gcm1* no dia 9,5 de gestação, concomitante ao aumento na expressão de *Sincitina B* que atinge níveis maiores ainda no dia 10,5 de gestação, período em que o labirinto se mostra em franco desenvolvimento. Estes achados sugerem a relação de interdependência entre a expressão de ambos, com a necessidade da expressão de *Gcm1* para a indução da expressão de *Sincitina B*.

Assim como a *Sincitina B*, também observamos aumento da expressão de *Sincitina A* ao longo do período estudado, o que coincide com o desenvolvimento da camada sincicial e expansão da região interhemal, corroborando dados da literatura (SIMMONS et al., 2008; HUGHES et al. 2013; HENKE et al., 2013). A *Sincitina A* é expressa exclusivamente na camada sincicial II (GONG et al., 2007; SIMMONS et al., 2008; HENKE et al., 2013) e sua expressão não é dependente de *Gcm1*, mas parece ser regulada pela expressão de *Ly6e*, uma proteína extracelular associada à membrana celular (HUGHES et al., 2013; BACQUIN et al., 2017).

Como esperado, o fator homeobox *Dlx3*, importante no desenvolvimento, organização e disposição espacial dos vasos fetais para as trocas moleculares no labirinto placentário, também apresentou expressão aumentada em nossas amostras. Evidencias acumuladas na literatura mostraram que mutantes *knockouts* para *Dlx3* não desenvolvem vascularização labiríntica e não sobrevivem após o dia 9,5 de gestação (MORASSO et al., 1999).

Em conjunto, nossos achados mostram que os fatores fundamentais para a formação das camadas sinciciais do labirinto placentário estão sendo temporal e espacialmente expressos permitindo-nos estabelecer uma janela de diferenciação desse processo em camundongos da linhagem CD1, que se inicia no dia 9,5 de gestação, se estendendo de forma mais proeminente no dia 10,5 de gestação. Neste contexto, procuramos investigar nesta fase de formação do labirinto e sincicialização, a expressão de Caspase-8.

A expressão proteica de Caspase-8 na região labiríntica, tanto em sua proforma, quanto em sua forma ativa, foi encontrada principalmente no dia 9,5 da gestação, coincidindo com o início da formação da barreira interhemal.

A Caspase-8 intrinsicamente relacionada a processos de morte celular programada (apoptose) tem sido relacionada à formação do sinciciotrofoblasto na placenta humana.

Na via clássica de indução de morte celular por apoptose, a Pró-Caspase-8 é clivada para sua forma ativa após a ligação de TNF-α a seus receptores de membrana TNFαR ou Fas (YUI et al., 1996; HUPPERTZ et al., 1999; LI et al., 2014). Uma vez ativa, essa proteína altera a assimetria da bicamada lipídica constituinte da membrana celular por externalização de fosfolipídios contendo fosfatidilserina (LI et al., 2014). Com este desbalanço, as proteínas do citoesqueleto que possuem sítios ligantes à fosfatidilserina e que são responsáveis por mantê-la internamente na célula também sofrem clivagem pela forma ativa da Caspase-3, esta também ativada por Caspase-8 (LI et al., 2014). Uma dessas proteínas de citoesqueleto é a Citoqueratina 18 e sua clivagem leva à exposição de epítopos, dentre eles o M30, cuja detecção caracteriza o processo de morte celular mediado por caspases (LEERS et al., 1999).

Na placenta humana, entretanto, a cascata de apoptose iniciada pela Caspase-8 é interrompida após a externalização da Fosfatidilserina por inibidores de apoptose da família Bcl-2, impedindo a ativação da Caspase-3, não havendo, consequentemente, a clivagem da Citoqueratina 18, nem a exposição de M30 (LI et al., 2014). A externalização da Fosfatidilserina parece ser uma condição importante que favorece o processo de fusionamento das células trofoblásticas para a formação do sinciciotrofoblasto (HUPPERTZ et al., 1999; BLACK et al., 2004).

Assim como na placenta humana, não encontramos relação entre a expressão de Caspase-8 clivada e apoptose no dia 9,5 de gestação. A ausência de imunolocalização de M30 e reatividade ao TUNEL na placa coriônica sugere a participação da caspase-8 em outros processos que não na morte das células trofoblásticas.

Em conjunto, nossos achados definiram a fase de formação das camadas sinciciais da barreira interhemal da placenta de camundongos CD-1, cujo início coincide com a expressão de Caspase-8 clivada, que, por sua vez, não parece estar relacionada a processos de morte nesta população celular.

Em uma tentativa de compreender melhor a possível participação da Caspase-8 na morfogênese labiríntica, realizamos estudos *in vitro*, utilizando células trofoblásticas labirínticas isoladas e cultivadas.

O cultivo que apresentou características mais interessantes e que eventualmente poderia mimetizar a diferenciação *in vivo*, foi o de células isoladas do dia 9,5 de gestação. As células obtidas neste período gestacional alteraram suas morfologias após 24 horas de cultivo, assumindo arranjos típicos em ninhos celulares CK^+, intercalados por células pequenas e fusiformes que não se agregavam (algumas das quais $CD31^+$). Em alguns destes ninhos, agregados nucleares se sobrepunham e lembravam a formação de uma massa sincicial. A importância do co-cultivo de células endoteliais em células trofoblásticas tem sido mostrada através de estudos com modelos *ex vivo* onde sua presença mostra-se essencial na manutenção dos marcadores diferenciais trofoblásticos (STECCA et al., 2002; PROCTOR et al., 2009; HOU et al., 2016). Trabalhos recentes vêm mostrando que mais importante que a presença, o contato entre as células coriônicas e as provenientes do alantoide (células endoteliais do labirinto) são necessárias para a manutenção da expressão de genes como *Gcm1* e *Sincitina-A* (HOU et al., 2016).

A imunolocalização de EpCAM foi maior no ponto zero de cultivo (6 horas após o plaqueamento), diminuindo sua expressão e permanecendo restrita às células periféricas dos ninhos celulares após 24 e 48 horas de cultivo. Ao contrário, a imunolocalização de Slc16A3, que era fraca no início do cultivo, foi mais intensa ao longo dos dias subsequentes e, principalmente nas células centrais dos ninhos. Este achado sugere que nestas regiões, ocorra a presença do transportador encontrado

após o processo de sincicialização. Em suma, embora neste estudo não tenha sido analisado um painel de marcadores moleculares da diferenciação trofoblástica sincicial, os resultados morfológicos e imunohistoquímicos parecem ser compatíveis com essa possibilidade. Em consonância, a análise da expressão gênica destas células ao longo das 48 horas de cultivo mostrou aumento de Sincitina A/B, um fator determinante na ativação do destino destas células para formar massas sinciciais (DUPRESSOIR et al., 2005, 2011; SIMMONS et al., 2008).

Após esta etapa de caracterização, foi realizado tratamento com o inibidor farmacológico de Caspase-8, o z-IETD-fmk. Os inibidores de caspase FMK são caracterizados por conter uma sequência peptídica de quatro aminoácidos baseada na sequência alvo do substrato, agindo como um inibidor competitivo (LAWRENCE; CHOW, 2012). Conjugado à sequência peptídica inibidora, há uma halometilquetona, como a fluormetilquetona (FMK), responsável por formar pontes covalentes irreversíveis com o grupo S-H do sítio ativo da caspase alvo (LAWRENCE; CHOW, 2012). O grupo aminoterminal do inibidor de caspase-8 - o grupo benziloxicarbonil (z) - aumenta a permeabilidade do inibidor, tornando-o mais hidrofóbico, facilitando sua entrada nas células (LAWRENCE; CHOW, 2012).

Nossas análises por *Western Blot* confirmaram a diminuição da expressão de Caspase-8 ativa após 24 horas do tratamento com o inibidor e bloqueio total após 48 horas. Alterações morfológicas e gênicas, entretanto, foram observadas já nas primeiras horas após o tratamento. A morfologia das células cultivadas se mostrou completamente alterada em relação ao controle, não havendo formação de ninhos celulares, nem estruturação rendilhada, como observado nas culturas não tratadas. A expressão dos genes de diferenciação sincicial (*Sincitinas A/B*) e do marcador de células progenitoras (*EpCAM*), mostrou-se reduzida ao longo do período estudado, sendo mais pronunciada após 48 horas do tratamento.

Muitos estudos demonstraram que o processo de sincicialização das células placentárias é dependente da atuação da Caspase-8 clivada (HUPPERTZ et al., 1998; 1999; PÖTGENS et al., 2002; BLACK et al., 2004). No entanto, outros dois estudos questionaram essa dependência e sugeriram a possibilidade de diferentes vias para a atuação da Caspase-8 nesse processo, principalmente no que se refere a externalização da Fosfatidilserina e clivagem da α-Fodrina (ROTE et al., 2010; GUILBERT et al., 2010). Rote e colaboradores (2010) não observaram aumento de

Caspase-8 ou sua ativação durante o processo de sincicialização das células BeWo, quando este processo foi induzido por forscolina. Tratamento com um inibidor de caspase Z-VAD-fmk e vanadato, apenas diminuíram o efluxo de fosfatidilserina e a fusão entre células. A fusão somente foi completamente inibida quando as células foram tratadas com inibidor de PKA, independentemente da ativação ou não da cascata de apoptose (ROTE et al., 2010). Guilbert e colaboradores (2010) também mostraram que a inibição de Caspase-8, atrasa mas não impede a fusão trofoblástica. Segundo os autores, o efluxo de Fosfatidilserina é uma etapa imprescindível para a fusão entre células, esse processo é dependente de ATP e da proteína quinase A (PKA), mas independente de apoptose e ativação de caspases. Ainda, o significado dos baixos níveis de ativação da Caspase-8 no citotrofoblasto permanece controverso; a inibição de Caspase-8 corroboraria potenciais funções relacionadas à diferenciação trofoblástica, mas não aquelas relacionadas ao início da fusão intercelular.

Gauster e colaboradores (2010) argumentam que as células BeWo utilizadas para os experimentos de fusão são provenientes de coriocarcinoma e que desta forma podem ter sofrido alterações em suas vias de indução de apoptose. Neste trabalho foram mostradas diferenças na ativação do processo de fusão celular nos diferentes modelos de estudo *in vitro*: linhagem BeWo e células citotrofoblásticas humanos isoladas de vilos coriônicos. Nas células BeWo, a inibição de Caspase-8 (tratamento com oligopeptídeos ou z-IETD-fmk) levou à clivagem da Fodrina, mas associada a uma baixa taxa de fusão celular, diferentemente do observado em células isoladas da placenta. Os autores mostraram em diferentes modelos que o processo de sincicialização é dependente da ação de Caspases (Caspase-8, -3 e -9) durante a diferenciação de células citotrofoblásticas humanas, na medida em que esta ativação leva à clivagem da α-Fodrina.

A α-Fodrina (também conhecida como Espectrina-αII) faz parte de uma família grande de proteínas conhecida como Espectrinases; essa isoforma é encontrada predominantemente em células nucleadas (METRAL et al., 2009). Essas proteínas são importantes na manutenção da estruturação de barreiras e do arcabouço celular através de interações com fosfolipídios de membrana, como a Fosfatidilserina, com os microfilamentos de actina e moléculas de adesão, como a Lu/BCAM, entre outras (MACHNICKA et al., 2012).

O silenciamento de Espectrina-αII em células de linhagem celular de melanoma humano, além de alterações no citoesqueleto, leva também a um arraste do ciclo celular na fase G1 e a diminuição do percentual de células em fases S e G2/M (METRAL et al., 2009; MACHNICKA et al., 2012). A participação desta proteína no controle do ciclo celular é extremamente importante, porém ainda pouco elucidada. Ainda, estudos de proteômica sugerem a presença de Espectrina-α na formação e ativação do receptor 1 do TGF-β, que também desempenha papel regulador do ciclo celular, de forma que sua ausência resultaria em defeitos nessa via de sinalização, (TANG et al., 2003; CONROTTO et al., 2007).

Estudo realizado em fibroblastos de embriões de camundongo mostra que a passagem da fase G1 do ciclo celular para a fase S é dependente a ativação de ciclina D_1, mediada por NF-κB, um importante fator da via de sinalização do TGF-β (LEDOUX; PERKINS, 2014). Uma vez comprometida essa via, todo o controle do ciclo celular pode ser alterado. Em células T tratadas com z-IEDT-fmk a sinalização de NF-κB se mostra suprimida (LAWRENCE; CHOW, 2012).

Neste contexto, considerando a possível ação da Caspase-8 na clivagem da α-Fodrina, uma explicação plausível para os nossos achados (diminuição dos fatores gênicos de diferenciação sincicial, desorganização morfológica) poderia ser a saída ou arraste do ciclo celular das células tratadas com o inibidor de Caspase-8. Esta inibição impediria a clivagem da α-Fodrina/Espectrina-αII e consequentemente, alteraria a regulação do ciclo celular e a diferenciação trofoblástica correta (organização em nichos celulares possivelmente sincicializados dessas células, como encontrado nas culturas controle). Desta forma, a Caspase-8 pode representar um possível mediador da diferenciação labiríntica de placentas de camundongos, agindo por meio de mecanismos que interferem no controle de ciclo celular e interação com proteínas constitutivas de membrana, como a α-fodrina.

Embora outros experimentos devam ser delineados para a confirmação desta premissa, nossos achados mostram que, assim como em placentas humanas, a Caspase-8 possui um papel importante no processo de organização das camadas sinciciais da placenta de roedores, influenciando tanto na expressão gênica correta das populações trofoblásticas presentes, quanto na organização morfológica das mesmas.

7 CONCLUSÕES

Baseados em nossos resultados, podemos concluir que:

1. A formação das camadas sinciciais da placenta de camundongos CD-1 pode ser acompanhada morfológica e molecularmente a partir do dia 9,5 de gestação.
2. Neste período houve aumento da expressão de Caspase-8 clivada não relacionada a apoptose, o que sugere sua participação no processo de formação do labirinto.
3. Células labirínticas obtidas de placentas aos 9,5 dias de gestação isoladas e cultivadas expressam marcadores de sincicialização e características morfológicas peculiares, mostrando-se um modelo útil para estudos de morfogênese sincicial.
4. Assim como nas amostas de placenta, células labirínticas obtidas no dia 9,5 de gestação e cultivadas também apresentam altos níveis de expressão de Caspase-8 clivada, o que reforça a possível relação desta enzima com o desenvolvimento das camadas sinciciais no labirinto placentário.
5. As alterações morfológicas e na expressão de marcadores de diferenciação das camadas sinciciais após o bloqueio farmacológico da Caspase-8 reforçam sua possível participação na diferenciação labiríntica.

Em suma, nossos resultados indicam um novo fator - a Caspase-8 - como um possível mediador da diferenciação da camada labiríntica, contribuindo desta forma, para a compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento da placenta de camundongos. Também, caracterizam um modelo alternativo de estudo *in vitro*, que poderá contribuir para estudos moleculares mais aprofundados sobre a biologia da barreira materno-fetal.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, 266 (6), p. 603-628, 1993.

2. ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D. G.; HEUSER, J. E.; WANG, X.; AKEY, C. W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. **Molecular cell**, *9*(2), p. 423-432, 2002.

3. ADAMSON, S. L.; LU, Y.; WHITELEY, K. J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M.; PFARRER, C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Developmental Biology**, 250, p. 358–73, 2002.

4. ADLER, R. R.; NG, A. K.; ROTE, N. S. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR. **Biology of Reproduction**, 53, p. 905–910, 1995.

5. AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G. S.; CORRÊA, S. T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, 128, p. 207–218, 2004.

6. ANSON-CARTWRIGHT, L.; DAWSON, K.; HOLMYARD, D.; FISHER, S. J.; LAZZARINI, R. A.; CROSS, J. C. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. **Nature Genetics**, 25, p. 311–314, 2000.

7. BACQUIN, A.; BIREAU, C.; TANGUY, M.; ROMANET, C.; VERNOCHET, C.; DUPRESSOIR, A.; HEIDMANN, T. A Cell Fusion-Based Screening Method Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Ly6e as the Receptor for Mouse Endogenous Retroviral Envelope Syncytin-A. **Journal of Virology**, 91(18), e00832-17, 2017.

8. BACZYK, D.; SATKUNARATNAM, A.; NAIT-OUMESMAR, B.; HUPPERTZ, B.; CROSS, J. C.; KINGDOM, J. C. Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta, **Placenta**, 25, p. 553-559, 2004.

9. BASYUK, E.; CROSS, J. C.; CORBIN, J.; NAKAYAMA, H.; HUNTER, P.; NAIT-OUMESMAR, B.; LAZZARINI, R. A. Murine Gcm1 gene is expressed in a

subset of placental trophoblast cells. **Developmental Dynamics**, 214 (4), p. 303-311, 1999.

10. BEVILACQUA, E. M.; ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Archivos de Biologia y Medicina Experimentales**, 22, p. 107–118, 1989.

11. BEVILACQUA, E. M.; ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **Journal of Morphology**, 198, p. 341–351, 1988.

12. BEVILACQUA, E.; LORENZON, A. R.; BANDEIRA, C. Biology of the ectoplacental cone. In: CROY, B. A.; YAMADA, F. J.; ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Elsevier, c. 10, p. 113-124, 2014.

13. BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, 27, S93-S104, 2008.

14. BLACK, S.; KADYROV, M.; KAUFMANN, P.; UGELE, B.; EMANS, N.; HUPPERTZ, B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. **Cell Death & Differentiation**, 11, p. 90-98, 2004.

15. BLAISE, S.; DE PARSEVAL, N.; BÉNIT, L.; HEIDMANN, T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(22), p. 13013-13018, 2003.

16. BLOND, J. L.; LAVILLETTE, D.; CHEYNET, V.; BOUTON, O.; ORIOL, G.; CHAPEL-FERNANDES, S.; MANDRAND, B.; MALLET, F.; COSSET, F. L. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. **Journal of Virology**, 74(7), p. 3321-3329, 2000.

17. BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in Cell Biology**, 15(6), p. 725-731, 2003.

18. BOUILLOT, S.; RAMPON, C.; TILLET, E.; HUBER, P. Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. **Placenta**, 27, p. 882–888, 2006.

19. BURTON, G. J.; FOWDEN, A. I. Review: the placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. **Placenta**, 33, Suplement A, Trophoblast Research, 26, p. S23-S27, 2012.

20. BURTON, G. J.; SKEPPER, J. N.; HEMPSTOCK, J.; CINDROVA, T.; JONES, C. J.; JAUNIAUX, E. A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. **Placenta**, 24, p. 297-305, 2003.

21. CARNEY, E. W.; PRIDEAUX, V.; LYE, S. J.; ROSSANT, J. Progressive expression of trophoblast-specific genes during formation of mouse trophoblast giant cells in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 34, p. 357–368, 1993.

22. COAN, P. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Ultrastructural changes in the interhaemal membrane and junctional zone of the murine chorioallantoic placenta across gestation. **Journal of Anatomy**, 207, p. 783–796, 2005.

23. CONROTTO, P.; YAKYMOVYCH, I.; YAKYMOVYCH, M.; SOUCHELNYTSKYI, S. Interactome of transforming growth factor-β type I receptor (TβRI): inhibition of TGFβ signaling by Epac1. **Journal of Proteome Research**, 6(1), p. 287-297, 2007.

24. COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta: an overview. **Reproductive biomedicine online**, 32(1), p. 14-43, 2016.

25. CROSS, J. C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 11, p. 105–113, 2000.

26. CROSS, J. C.; HEMBERGER, M.; LU, Y.; NOZAKI, T.; WHITELEY, K.; MASUTANI, M. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 187, p. 207–212, 2002.

27. CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, 266, p. 1508–1518, 1994.

28. CROY, B. A.; ZHANG, J.; TAYADE, C.; COLUCCI, F.; YADI, H.; YAMADA, A.T. Analysis of uterine natural kiler cells in mice. **Methods in Molecular Biology**, 612, p. 465–503, 2010.

29. CROY, B. A.; HE, H.; ESADEG, S.; WEI, Q.; MCCARTNEY, D.; ZHANG, J.; BORZYCHOWSKI, A.; ASHKAR, A. A.; BLACK, G., P.; EVANS, S. S., CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO JR, V. A.; YAMADA, A.

T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, 126(2), p. 149-160, 2003.

30. CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Caspase activation pathways: some recent progress. **Cell Death & Differentiation**, 16, p. 935, 2009.

31. DAIKOKU, T.; CHA, J.; SUN, X.; TRANGUCH, S.; XIE, H.; FUJITA, T.; HIROTA, Y.; LYDON, J.; DEMAYO, F.; MAXSON, R.; DEY, S. K. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. **Developmental Cell**, 21(6), p. 1014-1025, 2011.

32. DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, 116(2), p. 205-219, 2004.

33. DUPRESSOIR, A.; MARCEAU, G.; VERNOCHET, C.; BÉNIT, L.; KANELLOPOULOS, C.; SAPIN, V. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102, p. 725–730, 2005.

34. DUPRESSOIR, A.; VERNOCHET, C.; BAWA, O.; HARPER, F.; PIERRON, G.; OPOLON. P.; HEIDMANN, T. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106(29), p. 12127-12132, 2009.

35. DUPRESSOIR, A.; VERNOCHET, C.; HARPER, F.; GUÉGAN, J.; DESSEN, P.; PIERRON, G. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108, p. 1164–1173, 2011.

36. ENDERS, A. C. Formation of syncytium from cytotrophoblast in the human placenta. **Obstetrics & Gynecology**, 25 (3), p. 378-386, 1965.

37. ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation in the rat. **American Journal of Anatomy**, 120, p. 185–226, 1967.

38. EVSEENKO, D. A.; PAXTON, J. W.; KEELAN, J. A. The xenobiotic transporter ABCG2 plays a novel role in differentiation of trophoblast-like BeWo cells. **Placenta**, 28, p. S116-S120, 2007.

39. FAVARO, R.; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, M. T. Decidualization and endometrial extracellular matrix remodeling. In: CROY, B. A.; YAMADA, F. J.; ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Elsevier, c. 11, p. 125-142, 2014.

40. FRASER, A.; EVAN, G. A license to kill. **Cell**, 85, p. 781-784, 1996.

41. FRENDO, J. L.; THÉROND, P.; BIRD, T.; MASSIN, N.; MULLER, F.; GUIBOURDENCHE, J.; LUTON, D.; VIDAUD, M.; ANDERSON, W. B.; EVAIN-BRION, D. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. **Endocrinology**, 142(8), p. 3638-3648, 2001.

42. GAUSTER, M.; SIWETZ, M.; HUPPERTZ, B. Fusion of villous trophoblast can be visualized by localizing active caspase 8. **Placenta,** 30(6), p. 547-550, 2009.

43. GERBAUD P.; PIDOUX G. Review: an overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. **Placenta**, 36, (Suppl. 1), p. S35–S42, 2015.

44. GONÇALVES, C. R.; ANTONINI, S.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; BEVILACQUA, E. Developmental changes in the ploidy of mouse implanting trophoblast cells in vitro. **Histochemistry and Cell Biology**, 119, p. 189–198, 2003.

45. GONG, R.; HUANG, L.; SHI, J.; LUO, K.; QIU, G.; FENG, H.; TIEN, P.; XIAO, G. Syncytin-A mediates the formation of syncytiotrophoblast involved in mouse placental development. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 20(5), p. 517-526, 2007.

46. GONZALEZ, B.; DENZEL, S.; MACK, B.; CONRAD, M.; GIRES, O. EpCAM Is Involved in Maintenance of the Murine Embryonic Stem Cell Phenotype. **Stem Cells**, 27, p. 1782–1791, 2009.

47. GRAF, C.; LEE, C. T.; MEIER-ANDREJSZKI, L. E.; NGUYEN, M. T.; MAYER, M. P. Differences in conformational dynamics within the Hsp90 chaperone family reveal mechanistic insights. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 1, 2014.

48. GUDE, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONIS, B.; KING, R. G. Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, 114(5), p. 397-407, 2004.

49. GUZMAN-AYALA, M.; BEN-HAIM, N.; BECK, S.; CONSTAM, D. B. Nodal protein processing and fibroblast growth factor 4 synergize to maintain a trophoblast stem cell microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101, p. 15656–15660, 2004.

50. HAFFNER-KRAUSZ, R.; GORIVODSKY, M.; CHEN, Y.; LONAI, P. Expression of Fgfr2 in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development. **Mechanisms of Development**, 85, p. 167-172, 1999.

51. HEMBERGER, M.; CROSS, J. C. Genes governing placental development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 12, p. 162-168, 2001

52. HENKE, C.; RUEBNER, M.; FASCHINGBAUER, F.; STOLT, C. C.; SCHAEFER, N.; LANG, N.; BECKMANN, M. W.; STRISSEL, P. I.; STRICK, R. Regulation of murine placentogenesis by the retroviral genes syncytin-A, syncytin-B and Peg10. **Differentiation**, 85, p. 150-160, 2013.

53. HERNANDEZ-VERDUN, D. Morphogenesis of the syncytium in the mouse placenta. Ultrastructural study. **Cell and Tissue Research**, 148, p. 381–396, 1974.

54. HIRABAYASHI, H.; SATO, T.; KOHNO, S.; TANAKA, M.; KOBAYASHI, S.; OHTA, Y.; IGUCHI, T. Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. **The Anatomical Record**, 254(2), p. 205-213, 1999.

55. HOU, W.; SARIKAYA, D. P.; JEROME-MAJEWSKA, L. A. *Ex vivo* culture of pre-placental tissues reveals that the allantois is required for maintained expression of *Gcm1* and *Tpbpα*. **Placenta**, 47, p. 12-23, 2016.

56. HU, D.; CROSS, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **The International Journal of Developmental Biology**, 54, p. 341–354, 2010.

57. HUGHES, M.; DOBRIC, N.; SCOTT, I. C.; SU, L.; STAROVIC, M.; ST-PIERRE, B. The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. **Developmental Biology**, 271, p. 26–37, 2004.

58. HUGHES, M.; NATALE, B. V.; SIMMONS, D. G.; NATALE, D. R. C. Ly6e expression is restricted to syncytiotrophoblast cells of the mouse placenta. **Placenta**, 34(9), p. 831-835, 2013.

59. HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anatomy and Embryology**, 200, p. 1-18, 1999.

60. HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; KINGDOM, J. C.; REISTER, F.; KAUFMANN, P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, 110, p. 495-508, 1998.

61. 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. **Laboratory Investigation**, 79, p. 1687-702, 1999.

62. HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 195, p. 29–39, 2006.

63. HUPPERTZ, B.; TEWS, D. S.; KAUFMANN, P. Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. **International Review of Cytology**, 205, p. 215-253, 2001.

64. HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; KINGDOM, J. C.; REISTER, F.; KAUFMANN, P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, 110, p. 495-508, 1998.

65. ISHIDA, M.; ONO, K.; TAGUCHI, S.; OHASHI, S.; NAITO, J. I.; HORIGUCHI, K. Cathepsin gene expression in mouse placenta during the latter half of pregnancy. **Journal of Reproduction and Development**, 50, p. 515–523, 2004.

66. IWATSUKI, K.; SHINOZAKI, M.; SUN, W.; YAGI, S.; TANAKA, S.; SHIOTA, K. A novel secretory protein produced by rat spongiotrophoblast. **Biology of Reproduction**, 62(5), p. 1352-1359, 2000.

67. JOLLIE, W. P. Fine structural changes in placental labyrinth of the rat with increasing gestational age. **Journal of Ultrastructure Research**, 10, p. 27-47, 1963.

68. 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**, 1, p. 44, 2003.

69. KATZ, S.; ABRAHAMSOHN, P. A. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. **Anatomy and Embryology**, 176(2), p. 251-258, 1987.

70. KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO journal**, 14(22), p. 5579, 1995.

71. KWEE, L.; BALDWIN, H. S.; SHEN, H. M.; STEWART, C. L.; BUCK, C.; BUCK, C. A. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. **Development**, 121, p. 489–503, 1995.

72. LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, 82, p. 220–225, 2007.

73. LAVIALLE, C.; CORNELIS, G.; DUPRESSOIR, A.; ESNAULT, C.; HEIDMANN, O.; VERNOCHET, C.; HEIDMANN, T. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 368(1626), 20120507, 2013.

74. LAWRENCE, C. P.; CHOW, S. C. Suppression of human T cell proliferation by the caspase inhibitors, z-VAD-FMK and z-IETD-FMK is independent of their caspase inhibition properties. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 265 (1), p. 103-112, 2012.

75. LEDOUX A. C.; PERKINS N. D. NF-kappaB and the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, 42, p. 76–81, 2014.

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

77. LESCISIN, K. R.; VARMUZA, S.; ROSSANT, J. Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. **Genes & Development**, 2, p. 1639–1646, 1988.

78. LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, 27(48), p. 6194-6206, 2008.

79. LI, K.; WU, D.; CHEN, X.; ZHANG, T.; ZHANG, L.; YI, Y.; MIAO, Z.; JIN, N.; BI, X.; WANG, H.; XU, J.; WANG, D. Current and emerging biomarkers of cell death in human disease. **BioMed Research International**, 2014, 2014.

80. LIANG, C. Y.; WANG, L. J.; CHEN, C. P.; CHEN, L. F.; CHEN, Y. H.; CHEN, H. GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta. **Biology of Reproduction**, 83(3), p. 387-395, 2010.

81. LITVINOV, S. V.; VAN DRIEL, W.; VAN RHIJN, C. M.; BAKKER, H. A.; VAN KRIEKEN, H.; FLEUREN, G. J.; WARNAAR, S. O. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. **The American Journal of Pathology,** 148, p. 865–875, 1996.

82. LITVINOV, S. V.; VELDERS, M. P.; BAKKER, H. A.; FLEUREN, G. J.; WARNAAR, S. O. EpCAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. **Journal of Cell Biology**, 125, p. 437–446, 1994.

83. LU, T.; LU, R. M.; LIAO, M. Y.; YU, J.; CHUNG, C. H.; KAO, C. F.; WU , H. C. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, 285: p. 8719–8732, 2010.

84. LU, X.; HE, Y.; ZHU, C.; WANG, H.; CHEN, S.; LIN, H. Y. Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1. **Placenta**, 39, p. 45-54, 2016.

85. MA, W. G.; SONG, H.; DAS, S. K.; PARIA, B. C.; DEY, S. K. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(5), p. 2963–2968, 2003

86. MA, G. T.; LINZER, D. I. GATA-2 restricts prolactin-like protein A expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse. **Biology of Reproduction**, 63, p. 570–574, 2000.

87. MACHNICKA, B.; GROCHOWALSKA, R.; BOGUSŁAWSKA, D. M.; SIKORSKI, A. F.; LECOMTE, M. C. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 69, p. 191–201, 2012

88. MARZIONI, D.; MÜHLHAUSER, J.; CRESCIMANNO, C.; BANITA, M.; PIERLEONI, C.; CASTELLUCCI, M. BCL-2 expression in the human placenta and its correlation with fibrin deposits. **Human Reproduction**, 13(6), p. 1717-1722, 1998.

89. MCQUALTER, J. L.; YUEN, K.; WILLIAMS, B.; BERTONCELLO, I. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, p. 1414–1419, 2010.

90. METRAL, S.; MACHNICKA, B.; BIGOT, S.; COLIN, Y.; DHERMY, D.; LECOMTE, M. C. II-Spectrin Is Critical for Cell Adhesion and Cell Cycle. **Journal of Biological Chemistry**, 284, p. 2409 –2418, 2009.

91. MI, S.; LEE, X.; LI, X. P.; VELDMAN, G. M.; FINNERTY, H.; RACIE, L.; LAVALLIE, E.; TANG, X. Y.; EDOUARD, P.; HOWES, S.; KEITH, J. C.; MCCOY, J. M. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. **Nature**, 403(6771), p. 785-789, 2000.

92. MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. L. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, 252, p. 1-15, 1998.

93. MORASSO, M. I.; GRINBERG, A.; ROBINSON, G.; SARGENT, T. D.; MAHON, K. A. Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96(1), p. 162-167, 1999.

94. MOULD, A.; MORGAN, M. A. J.; LI, L.; BIKOFF, E. K.; ROBERTSON, E. J.. Blimp1/Prdm1 governs terminal differentiation of endovascular trophoblast giant cells and defines multipotent progenitors in the developing placenta. **Genes & Development**, 26, p. 2063–2074, 2012.

95. NADEAU, V.; CHARRON, J. Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation. **Development**, 141(14), p. 2825-2837, 2014.

96. NAGAI, A.; TAKEBE, K.; NIO-KOBAYASHI, J.; TAKAHASHI-IWANAGA, H.; IWANAGA, T. Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice. **Placenta**, 31(2), p. 126-133, 2010.

97. NATALE, B. V.; SCHWEITZER, C.; HUGHES, M.; GLOBISCH, M. A.; KOTADIA, R.; TREMBLAY, E.; VU, P.; CROSS, J. C.; NATALE, D. R. C.Sca-1 identifies a trophoblast population with multipotent potential in the mid-gestation mouse placenta, **Scientific Reports**, 7, p. 5575 - 5591, 2017

98. OLIVEIRA, S. F.; ABRAHAMSOHN, P.; ZORN, T. M. Autoradiography reveals regional metabolic differences in the endometrium of pregnant and nonpregnant mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31(2), p. 307–312, 1998.

99. PAPADAKI, C.; ALEXIOU, M.; CECENA, G.; VERYKOKAKIS, M.; BILITOU, A.; CROSS, J. C. Transcriptional repressor erf determines extraembryonic ectoderm differentiation. **Molecular Cell Biology**, 27, p. 5201–5213, 2007.

100. PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, *5*(6), a008672, 2013.

101. PLUM, A.; WINTERHAGER, E.; PESCH, J.; LAUTERMANN, J.; HALLAS, G.; ROSENTRETER, B. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. **Developmental Biology**, 231, p. 334–347, 2001.

102. PÖTGENS, A. J. G.; SHMITZ, U.; BOSE, P.; VERSMOLD, A.; KAUFMANN, P.; FRANK, H. G. Mechanisms of syncytial fusion: a review. **Placenta**, 23, Supplement A, Trophoblast Research, 16, p. S107-S113, 2002.

103. RAI, A.; CROSS, J. C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. **Developmental Biology**, 387(2), p. 131-141, 2014.

104. RAMATHAL, C. Y.; BAGCHI, I. C.; TAYLOR, R. N.; BAGCHI, M. K. Endometrial decidualization: of mice and men. **Seminars in Reproductive Medicine**, 28, 1, p. 17-26, 2010.

105. REDLINE, R. W.; CHERNICKY, C. L.; TAN, H. Q.; ILAN, J.; ILAN, J. Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. **Molecular Reproduction and Development**, 36, p. 121–129, 1993.

106. ROPER, S.; HEMBERGER, M. Defining pathways that enforce cell lineage specification in early development and stem cells. **Cell Cycle**, 8, p. 1515–1525, 2009.

107. ROSSANT, J.; TAM, P. P. Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development. **Developmental Cell**, *7*(2), p. 155-164, 2004.

108. ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental Development: Lessons From Mouse Mutants. **Nature Reviews Genetics**, 2, p. 538-548, 2001.

109. ROTE, N. S.; WEI, B. R.; XU, C.; LUO, L. Caspase 8 and human villous cytotrophoblast differentiation. **Placenta**, 31(2), p. 89-96, 2010.

110. RUNIC, R.; LOCKWOOD, C. J.; MA, Y.; DIPASQUALE, B.; GULLER, S. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 81(8), p. 3119-3122, 1996.

111. SCHON, M. P.; SCHON, M.; KLEIN, C. E.; BLUME, U.; BISSON, S.; ORFANOS, C. E. Carcinomaassociated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. **Journal of Investigative Dermatology**, 102, p. 987–991, 1994.

112. SCHREIBER, J.; RIETHMACHER-SONNENBERG, E.; RIETHMACHER, D.; TUERK, E. E.; ENDERICH, J.; BÖSL, M. R.; WEGNER, M. Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa. **Molecular and Cellular Biology**, 20(7), p. 2466-2474, 2000.

113. SCOTT, I. C.; ANSON-CARTWRIGHT, L.; RILEY, P.; REDA, D.; CROSS, J. C. The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. **Molecular Cell Biology**, 20, p. 530–541, 2000.

114. SENNER, C. E.; KRUEGER, F.; OXLEY, D.; ANDREWS, S.; HEMBERGER, M. DNA methylation profiles define stem cell identity and reveal a tight embryonic-extraembryonic lineage boundary. **Stem Cells**, 30, p. 2732–2745, 2012.

115. SIMMONS, D. G.; CROSS, J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Developmental Biology**, 284, p. 12–24, 2005.

116. SIMMONS, D. G.; FORTIER, A. L.; CROSS, J. C. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. **Developmental Biology**, 304, p. 567–578, 2007.

117. SIMMONS, D. G.; NATALE, D. R. C.; BEGAY, V.; HUGHES, M.; LEUTZ, A.; CROSS, J. C. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. **Development**, 135, p. 2083–2091, 2008.

118. SIMMONS, D. G. Postimplantation development of the chorioallantoic placenta. In: CROY, B. A.; YAMADA, F.J.; ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Elsevier, 2014, p. 143-161.

119. SIMMONS, D.G.; RAWN, S.; DAVIES, A.; HUGHES, M.; CROSS, J. C. Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. **BMC Genomics**, 9, p. 352, 2008.

120. SLEE, E. A.; HARTE, M. T.; KLUCK, R. M.; WOLF, B. B.; CASIANO, C. A.; NEWMEYER, D. D.; WANG, H. G.; REED, J. C.; NICHOLSON, D. W.; ALNEMRI, E. S.; GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome c–initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9–dependent manner. **The Journal of Cell Biology**, 144(2), p. 281-292, 1999.

121. SNELL, G. D. **Biology of the laboratory mouse**. Ed. 2. New York: McCraw-Hill, 1966.

122. STAVELEY, B. E. **Patterning the Vertebrate Body Plan I: Axes and Germ Layers**. Model Mammalian Embryo: Mouse. Mouse embryo: post-implantation. Disponível em: < http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f23.jpg>. Acesso em 18 mai 2015.

123. STECCA, B.; NAIT-OUMESMAR, B.; KELLEY, K. A.; VOSS, A. K.; THOMAS, T.; LAZZARINI, R. A. Gcm1 expression defines three stages of chorio-allantoic interaction during placental development. **Mechanisms of Development**, 115(1), p. 27-34, 2002.

124. SUGIMOTO, J.; SUGIMOTO, M.; BERNSTEIN, H.; JINNO, Y.; SCHUS, D. A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion. **Scientific Reports**, 3, p. 1462 – 1471, 2013

125. TANAKA, S.; KUNATH, T.; HADJANTONAKIS, A. K.; NAGY, A.; ROSSANT, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. **Science**, 282, p. 2072–2075, 1998.

126. TANG, B.; VU, M.; BOOKER, T.; SANTNER, S. J.; MILLER, F. R.; ANVER, M. R.; WAKEFIELD, L. M. TGF-β switches from tumor suppressor to prometastatic

factor in a model of breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, 112(7), p. 1116, 2003.

127. UENO, M.; LEE, L. K.; CHHABRA, A.; KIM, Y. J.; SASIDHARAN, R.; VAN HANDEL, B.; WANG, Y.; KAMATA, M.; KAMRAN, P.; SERETI, K. I. ; JIANG, M.; MIKKOLA, H. K.A. c-Met-dependent multipotent labyrinth trophoblast progenitors establish placental exchange interface. **Developmental Cell**, 27(4), p. 373-386, 2013.

128. VOGT, E.; NG, A. K.; ROTE, N. S. A model for the antiphospholipid antibody syndrome: monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 174, p. 700–707, 1996.

129. VOSS, A. K.; THOMAS, T.; GRUSS, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. **Development**, 127(1), p. 1-11, 2000.

130. WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. **Physiology**, 20, p. 180–193, 2005.

131. YANG, J. T.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. **Development**, 121, p. 549–560, 1995.

132. YU, C.; SHEN, K.; LIN, M.; CHEN, P.; LIN, C.; CHANG, G. D.; CHEN, H. GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. **Journal of Biological Chemistry**, 277(51), p. 50062-50068, 2002.

133. YUI, J.; HEMMINGS, D.; GARCIA-LLORET, M.; GUILBERT, L. J. Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction. **Biology of Reproduction**, 55, p. 400-409, 1996.

134. ZHANG, J.; CHEN, Z.; SMITH, G. N.; CROY, B. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cellular & Molecular Immunology**, 8, p. 1–11, 2011.

135. ZORN, T. M.; PINHAL, M. A.; NADER, H. B.; CARVALHO, J. J.; ABRAHAMSOHN, P. A.; DIETRICH, C. P. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-le-Grand, France), 41(1), p. 97-106, 1995.