

Karina Kelly de Oliveira Luquesi Meça

APOPTOSE NA MATURAÇÃO DA PLACENTA BOVINA.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2010

Karina Kelly de Oliveira Luquesi Meça

APOPTOSE NA MATURAÇÃO DA PLACENTA BOVINA.

Tese apresentada no curso de Patologia Geral do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2010

Este trabalho foi realizado no laboratório de Apoptose no Departamento de Patologia Geral e no laboratório de Biologia Molecular no Departamento de Fisiologia e Biofísica, ambos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CNPq , FAPEMIG e CAPES.

Dedico esta vitória ao **DEUS, meu Pai,**
a **JESUS CRISTO, meu Salvador**
e ao **ESÍRITO SANTO, meu ajudador,**
ao meu marido: **Heldner,**
aos meus filhos: **Pedro e Laura,**
e aos meus pais: **José e Josefa.**

AGRADECIMENTOS

-À Deus, ao Senhor Jesus Cristo e ao Espírito Santo, pela sua salvação e pela sua maravilhosa Palavra que nos faz encontrar o verdadeiro sentido da vida.

-Ao meu amado Heldner, por ser um marido maravilhoso, um homem temente a Deus, valoroso e determinado. Obrigada por tudo! Te amo muito!

- Aos meus filhos: Pedro e Laura, minha herança verdadeira, meus tesouros que me alegram todos os dias. Amo muito vocês!

-À minha mãe e ao meu pai, por estarem sempre ao meu lado e nunca deixarem de acreditar em mim. Amo muito vocês!

-Ao Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos, pela preciosa amizade e por tudo que aprendi. E também pela paciência e compreensão.

-Ao Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho, por ter acreditado e me dado esta grande oportunidade de mudança de vida, pelos seus ensinamentos e amizade verdadeira.

- Ao Prof. Dr. Almir Martins, meu irmão, pela ajuda, aprendizado e amizade.

- A Prof^a. Dr. Milene Rachid, pela ajuda.

-Às pós-graduandas do laboratório de Apoptose: Helen Lima Del Puerto, minha irmã querida, pela amizade e essencial cooperação, a Bárbara Verçosa, a Nubia Pereira e a Luciana Villela, pela ajuda e pelo companheirismo.

-À técnica de laboratório Soraia Silva, pela ajuda e cooperação.

-Aos meus irmãos na fé, pelo sustento em orações.

-A todos os professores do curso de pós-graduação em Patologia Geral, pela contribuição na minha formação acadêmica.

-Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo por três anos, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

“AINDA que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.” (I Coríntios 13:1)

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 11 |
| INTRODUÇÃO | 12 |
| OBJETIVOS | 14 |
| Objetivo geral | 14 |
| Objetivos específicos | 14 |
| CAPÍTULO I | 15 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| A placenta bovina e sua maturação | 17 |
| Apoptose | 21 |
| Vias de ativação da apoptose | 22 |
| Proteínas Bcl-2 | 28 |
| Caspases | 28 |
| Apoptose na maturação e liberação da placenta | 29 |
| Referências Bibliográficas | 31 |
| CAPÍTULO II - Apoptose e expressão de bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação | 36 |
| CAPÍTULO III- Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidenciação imunoistoquímica e bioquímica. | 44 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 53 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | | |
|-----------------|---|----|
| FIGURA 1 | Estrutura e organização dos domínios das caspases de mamíferos. | 25 |
| FIGURA 2 | Estrutura do receptor de morte Fas. | 26 |
| FIGURA 3 | Via extrínseca de ativação da apoptose. | 27 |
| FIGURA 4 | Via intrínseca de ativação da apoptose. | 28 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-----------------|--|----|
| FIGURA 1 | Placenta de vaca mostrando células em apoptose (setas). (TUNEL) | 42 |
| FIGURA 2 | Crescimento progressivo do índice apoptótico com o avanço da gestação. | 43 |
| FIGURA 3 | Quantificação da expressão dos genes pela PCR em tempo real, Bcl-2 (A), caspase 3 (B) e caspase 8 (C). | 43 |
| FIGURA 4 | Eficácia da RTPCR do Bcl-2 (A) e das caspases 3 (B) e 8 (C). | 43 |
| FIGURA 5 | Expressão absoluta do Bcl-2 e das caspases 3 e 8, com 4, 6 e 9 meses de gestação. | 44 |

CAPÍTULO III

| | | |
|-----------------|---|----|
| FIGURA 1 | Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico extraído de três amostras diferentes de placenta, (1) 4 meses de gestação, (2) 6 meses de gestação, (3) 9 meses de gestação. | 53 |
| FIGURA 2 | Placenta de vaca mostrando marcação imunistoquímica da proteína Bcl-2. Complexo streptavidina-peroxidase, 40x. | 53 |
| FIGURA 3 | Placenta de vaca mostrando marcação imunistoquímica da proteína Bax. | 54 |

Complexo streptavidina-peroxidase, 40x.

FIGURA 4

Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica da proteína caspase 3

54

Complexo streptavidina-peroxidase, 40x.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| Água DEPC | Água tratada com dietilpirocarbonato |
| AIF | Fator de indução apoptótico |
| Apaf-1 | Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas |
| CAD | Dnase caspase ativada |
| CARD | Do inglês caspase recruitment domain, ou domínio de recrutamento de caspase |
| cDNA | Ácido Desoxirribonucléico complementar |
| DAB | cromógeno 3,3'-diaminobenzidina |
| DD | Do inglês death domain, ou domínio de morte |
| DED | Do inglês death effector domain, ou domínio efetor de morte |
| DNA | Do inglês Deoxyribonucleic acid ou Ácido Desoxirribonucléico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino |
| EtBr | Brometo de etídio |
| ETOH | Etanol |
| g | Grama |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IAP | Proteínas indutoras da apoptose |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| Mg ⁺² | Íon magnésio |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| μl | Microlitro |
| μm | Micrometro |
| mm | Milímetro |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| PGF | Prostaglandina F |
| PBS | Do inglês Phosphate Buffered Saline - Tampão de salina fosfatada |
| RP | Retenção de placenta |
| TdT | Do inglês Terminal deoxynucleotidyl Transferase - Transferase terminal de deoxinucleotídio |
| TNF-α | Do inglês Tumor Necrosis Factor alfa - Fator de necrose tumoral alfa |
| TUNEL | Do inglês "Terminal deoxynucleotidyl Transferase Uridine Nick End Labeling" - Marcação in situ da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídio |

INTRODUÇÃO

Ao contrário da necrose, a apoptose é um tipo de morte celular dependente de energia e síntese protéica. Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenham papel importante na função placentária. Ambos os processos são inversamente proporcionais ao longo da gestação (Boos et al., 2003). A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias de proteínas: A Bcl-2 e as Caspases.

Um dos principais eventos na apoptose é a ativação das caspases, as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. As caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico. Atualmente já estão descritas 12 tipos de caspases em mamíferos classificadas em dois principais grupos: Caspases iniciadoras (Caspases - 1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) e Caspases efetoras (Caspases 3, -6 e -7).

A família de proteínas Bcl-2 está subdividida em dois grupos: pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria; e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático. A proporção entre proteínas pró e anti-apoptóticas é que determina se a célula entrará ou não em apoptose.

A justificativa desta tese é elucidar os mecanismos da apoptose envolvidos na maturação da placenta bovina, bem como suas vias de ativação.

Esta tese objetivou avaliar quantitativamente a apoptose na placenta de vacas em diferentes idades gestacionais. Analisou-se a expressão de genes pró e anti- apoptóticos, como: Bcl-2, caspases 3 e 8, visando a esclarecer o envolvimento destes na via apoptótica ativada na maturação placentária.

Esta tese está estruturada na forma de capítulos, sendo que o primeiro capítulo é uma revisão de literatura, que foi submetida para publicação na PubVet, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, o segundo capítulo trata-se de um artigo, que já foi publicado no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (v.62, n.2, p.258-264, 2010), e enfoca a análise da expressão do mRNA dos genes das caspases 3 e 8 e

de Bcl-2, mediante a técnica de quantificação relativa da RT-PCR em tempo real na placenta de vacas em diferentes estágios de gestação, comparando com o índice apoptótico obtido através da histomorfometria em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina e pela reação de TUNEL. O terceiro capítulo é um artigo submetido para publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, que enfoca bioquímica e morfológicamente a apoptose em placenta de vacas em três diferentes estágios de gestação através de eletroforese do DNA em gel de agarose e da imunomarcção das proteínas produzidas pela expressão dos genes Bcl-2, Bax e caspase 3, através de imunistoquímica e a relação de Bax: Bcl-2.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a apoptose no processo de maturação placentária, em placentomas de vacas com diferentes idades gestacionais.

Objetivos específicos:

- Desenvolver iniciadores específicos de oligonucleotídeos para transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real de regiões alvos dos mRNAs de caspase 3, caspase 8 e bcl-2.
- Determinar a expressão de genes caspase 3, caspase 8 e bcl-2 no trofoblasto de vacas em diferentes idades gestacionais
- Correlacionar a fragmentação internucleossômica com o índice apoptótico do trofoblasto de vacas em diferentes idades gestacionais.
- Detectar a apoptose no trofoblasto de vacas em diferentes idades gestacionais através da imunohistoquímica de caspase 3, bcl-2 e bax.
- Determinar a relação Bax:Bcl-2 no trofoblasto de vacas em diferentes idades gestacionais.

CAPÍTULO I

APOPTOSE NA MATURAÇÃO DA PLACENTA BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA

APOPTOSIS IN THE MATURATION OF BOVINE PLACENTA: REVIEW

(Submetido e adaptado para PubVet)

Karina Kelly de Oliveira Luquesi Meça¹, Helen Lima Del Puerto²,
Anilton Cesar Vasconcelos³

¹ Doutoranda em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais

² Doutora em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais

³ Professor Titular - Coordenador do Laboratorio de Apoptose, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciencias Biologicas da UFMG

RESUMO. Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenha papel importante na função placentária. Ambos os processos são inversamente proporcionais ao longo da gestação. A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias: A Bcl-2 e as Caspases

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovino, apoptose, placenta, caspase 3, Bcl-2, bax

ABSTRACT. Both cell proliferation and apoptosis play important role in placental function. Both processes are inversely proportional throughout pregnancy. The regulation and execution of apoptosis is attributed mainly to two large families: The Bcl-2 and Caspases.

INDEX TERMS: cattle, apoptosis, placenta, caspase 3, Bcl-2, bax

REVISÃO DE LITERATURA

A placenta bovina e sua maturação

Durante a gestação são formadas entre 70 a 120 carúnculas no endométrio bovino (Marques Júnior et al., 1993). As carúnculas compõem a parte materna da placenta, sendo recobertas pelas membranas fetais que crescem e se expandem para dentro do lume uterino, formando estruturas fetais irregulares, que são conhecidas como cotilédones (Schafner et al., 2000). Os componentes fetais se constituem de endotélio, mesênquima e trofoblasto. Os maternos são epitélio uterino, tecido conjuntivo e endotélio (Ramsey, 1982). Entre os cotilédones há áreas de tecido coriônico liso (Ramsey, 1982). Assim, a placenta bovina é classificada como cotiledonária (Wooding, 1992), epiteliocorial ou sinepiteliocorial, vilosa (Ramsey, 1982), devido à presença dos vilos; não deciduada, por que as partes materna e fetal podem ser separadas sem causar danos à mucosa uterina após o parto (Bjorkman, 1970; Steven, 1975).

Com o crescimento placentário, os cotilédones projetam vilos coriônicos que se interdigitam com as criptas carunculares formando a unidade funcional da placenta, o placentomo (Amoroso, 1952; Steven, 1975). Essas interdigitações aumentam a superfície de contato entre o tecido fetal e materno (Steven; Morris, 1975). Segundo King et al. (1982), com a invasão dos vilos, os placentomos crescem aproximadamente cinco mil vezes, envolvendo próximo ao parto.

Vilos coriônicos são cones mesenquimatosos vascularizados, revestidos por células trofoblásticas cuboidais ou células principais mononucleadas e células gigantes com dois ou mais núcleos (Björkman, 1970; Jainudeen e Hafez, 1993).

As células trofoblásticas cuboidais mononucleadas possuem núcleos arredondados com grandes nucléolos. As células gigantes possuem núcleos esféricos, amplamente separados, com nucléolos

evidentes e citoplasma abundante. O epitélio da cripta uterina é cúbico ou achatado. Suas células possuem núcleos esféricos e nucléolos bem evidentes (Björkman, 1969).

Durante a gestação, as células binucleadas coriônicas migram do epitélio coriônico para se fundir com as células epiteliais uterinas. Essa fusão origina células multinucleadas. Com isso, forma-se um epitélio materno-fetal híbrido, explicando a classificação em placenta sinepiteliocorial (Wooding, 1992).

A liberação da placenta após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação do placentomo. As contrações uterinas durante o parto ajudam mecanicamente a eliminação placentária. Um fator determinante na liberação é a desagregação da vilosidade materno-fetal (Bjorkman, 1969).

O processo de maturação placentária envolve o achatamento do epitélio nas carúnculas maternas, que é intensificado 3 a 5 dias antes do parto (Grunert, 1984) e a diminuição do número de células binucleadas do trofoblasto e células epiteliais das carúnculas maternas (Santos, 1995; Wango et al., 1992). O feto aparentemente participa da manutenção da população de células binucleadas (Wooding, 1992) e as alterações hormonais antes do parto parecem favorecer a diminuição dessas células (Martins, 1999). O número de células nas criptas carunculares declina a partir dos 270 dias de gestação (Barreto Filho e Marques Júnior, 1993; Woicke et al., 1986).

A redução do suprimento sangüíneo das carúnculas maternas e da circulação placentó-fetal ajuda na desagregação feto-maternal após o parto. As vilosidades coriônicas tornam-se menos aderidas às criptas carunculares devido aos períodos alternados de hiperemia e isquemia e às enzimas proteolíticas, tais como a colagenase, que diminuem a adesão da matriz extracelular na interface materno-fetal (Jeffrey et al., 1991).

A liberação fisiológica da placenta ocorre geralmente entre 3 a 6 horas após o parto. A proteólise do cotilédone e a diminuição da

adesividade na interface carúncula-cotilédone resultam na liberação da placenta. As colagenases são capazes de reduzir a viscosidade específica do colágeno. A atividade dessas enzimas durante a liberação da placenta é aumentada nas vilosidades de vacas saudáveis e diminuída em vacas com retenção placentária (Gross et al., 1985).

A progesterona é o antagonista direto das contrações uterinas induzidas tanto pela ocitocina quanto pelas prostaglandinas. No dia anterior ao parto as concentrações plasmáticas de progesterona caem acentuadamente (Hafez e Jainudeen, 1995).

Segundo Gross et al. (1986), a administração de $PGF2\alpha$ uma hora antes do parto previne a retenção de placenta. As células binucleadas dos vilos coriônicos são a principal fonte de produção de prostaglandinas na placenta, a partir do ácido araquidônico (Gross e Williams, 1988).

Com o aparecimento das contrações uterinas há a compressão mecânica dos placentomos induzindo o relaxamento das vilosidades coriônicas o qual favorece o desprendimento dos cotilédones (Challis e Lye, 1994). Em seguida, com a presença de contrações abdominais, o feto é forçado para o interior da pelve e os placentomos são comprimidos contra o feto pela pressão da parede abdominal e contrações uterinas. Após a expulsão fetal o fluxo sangüíneo umbilical é interrompido. Com isso há isquemia dos vilos coriônicos e contração dos capilares facilitando a separação entre os vilos e as criptas. Nesse estágio, as contrações uterinas diminuem de amplitude, mas permitem a liberação da placenta (Hafez e Jainudeen, 1995).

Segundo Woicke et al. (1986), distúrbios no processo de maturação podem resultar na retenção placentária. Esses autores demonstraram experimentalmente que vacas com parto normal apresentavam o epitélio materno descontínuo com intenso achatamento e diminuição do número de células maternas. Por outro lado, animais com retenção apresentaram o epitélio das criptas

carunculares contínuo e com células cuboidais, indicando ausência de maturação. A retenção de placenta (RP) ou retenção das membranas fetais é conceituada como a ausência da separação da carúncula materna (retenção primária), ou a dificuldade mecânica em expelir a membrana fetal já separada (retenção secundária) (Eiler, 1997).

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

É difícil definir precisamente a retenção patológica da placenta considerando-se o tempo decorrido após o parto (Laven e Peters, 1996). As escalas de tempo usadas variam entre 6 e 71 horas (Van Werven et al., 1992). Segundo Eiler (1997), os efeitos danosos à performance reprodutiva, produção de leite, doença pós-parto e taxa de abate são principalmente detectados quando a retenção excede o período de 12 horas.

A incidência da RP em bovinos é muito variável, pois depende de como é definida e do país de origem (Laven e Peters, 1996).

A RP ocorre com freqüência em vacas leiteiras levando a transtornos reprodutivos no período pós-parto. Os efeitos da RP na fertilidade podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. O principal efeito direto da RP é o aumento no intervalo entre partos (Borsberry e Dobson, 1989; Erb et al., 1981). Os efeitos indiretos da RP na fertilidade estão associados com o desenvolvimento de metrite (Curtis et al., 1985).

A placenta retida é isquêmica, hipóxica e carente de nutrientes. No entanto, ela continua metabolicamente ativa por vários dias. Na presença de estresse metabólico, liberam-se mediadores bioquímicos

que causam imunossupressão no útero (PGE2), aumento da permeabilidade vascular (histamina e prostaglandinas), aumento da atividade lisossômica (proteólise), danos endometriais (liberação de histaminas por mastócitos) e redução da quimiotaxia e migração de leucócitos. A associação desses fatores pode levar à metrite e à conseqüente diminuição da fertilidade (Eiler, 1997).

Segundo Holm et al., (1964), a gestação prolongada pode levar à RP por ocasionar mudanças proliferativas no epitélio caruncular que, mecanicamente, impediriam a liberação da placenta. Da mesma forma, por deficiência mecânica de liberação, a placentite e a cotiledonite podem favorecer a RP. Metrite aguda pós-parto (ex.: pelo *Actinomyces pyogenes*) pode levar à inércia uterina, RP e placentite (Laven e Peters, 1996).

Apoptose

Ao contrário da necrose a apoptose é um tipo de morte celular dependente de energia e síntese protéica (Kerr e Searle, 1972). Em organismos multicelulares a homeostase é mantida através do balanço entre proliferação celular e apoptose (Li e Yuan, 2008). A apoptose tem grande importância fisiológica ao participar no desenvolvimento embrionário e na organogênese, na renovação de células epiteliais, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos na senilidade, na hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou de hormônios, na involução de alguns órgãos e ainda na regressão de tumores (Kerr, 1999). Desta forma, é um tipo de morte desejável, programada e seletiva, que envolve células isoladas sendo regulada intrínseca e extrínsecamente (Mcconkey, 1993).

Morfologicamente ocorre redução do volume celular, condensação da cromatina (picnose), modificações no citoesqueleto com formação de bolhas ("blebbings"), fragmentação do DNA em regiões específicas (nucleossomos) e fragmentação de núcleos e

organelas envoltos por membrana que formam os corpos apoptóticos (Alisson e Sarraf, 1992; Wyllie et al., 1980)

A condensação da cromatina inicia-se na região periférica do núcleo, se assemelhando à meia lua ou ferradura de cavalo. O DNA picnótico exhibe uma hipercromasia corando-se intensamente com sondas fluorescentes. O envelope nuclear desintegra-se, e as lamininas sofrem degradação proteolítica, seguida de fragmentação do núcleo (cariorrexe) (Darzynkiewicz et al., 1997).

A ativação de nucleases é a responsável pela clivagem do DNA entre os nucleossomos gerando fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos deles, o que permite que o DNA de uma célula apoptótica tenha forma de "escada" quando analisado em eletroforese de gel de agarose (Saraste, 1999).

Além da preservação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática na fase inicial da apoptose há também preservação das organelas celulares (mitocôndria e lisossomos). Ocorre também mobilização do íon cálcio intracelular, diminuição de microtúbulos e desorganização de fosfolipídeos na membrana plasmática, permitindo a translocação de fosfatidilserina (PS) da superfície interna da membrana para a superfície externa (Darzynkiewicz et al., 1997).

Vias de ativação da apoptose

Um dos principais passos da apoptose é a ativação das caspases, as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. As caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000). Estas proteínas são sintetizadas na sua forma inativa (pró-caspases) e são ativadas (caspases) após sinais de morte celular (Spanos et al., 2002).

Atualmente há descrito 12 tipos de caspases em mamíferos classificadas em dois principais grupos: Caspases iniciadoras (Caspases -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) e Caspases efetoras (Caspases 3, -6 e -7). As caspases iniciadoras possuem um prodomínio longo que contém uma região de interação proteína-proteína, que pode ser o domínio DED (domínio efetor de morte) ou o CARD (domínio de recrutamento de caspase) (Fig. 1). As caspases efetoras com um prodomínio curto (Fig. 1) desempenham um papel na fase de execução clivando vários tipos de substratos celulares, e são tipicamente ativadas pelas caspases iniciadoras, que iniciam o processo de morte. Após a ativação das caspases efetoras o mecanismo de ativação da apoptose torna-se irreversível (Li; Yuan, 2008).

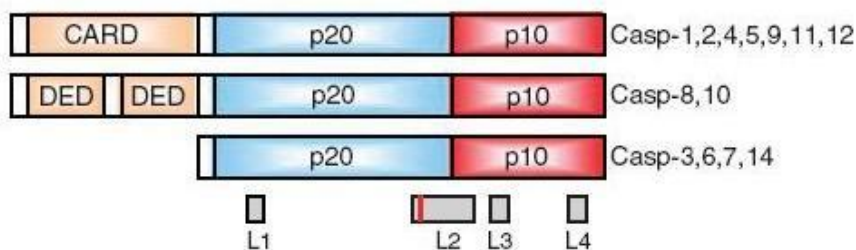


FIGURA 1 – Estrutura e organização dos domínios das caspases de mamíferos, e a localização dos centros catalíticos (L1-L4). (Fonte: J. Li and J. Yuan, Caspases in apoptosis and beyond, 2008, Oncogene, v. 27, 6194–6206).

Porém, a apoptose pode também ocorrer independentemente da ativação de caspases (Donovan e Cotter, 2004).

Para melhor compreensão pode-se dividir a ativação da apoptose em duas vias: a via extracelular (via extrínseca) e a intracelular (via intrínseca).

A via extrínseca da apoptose, também conhecida como “via do receptor de morte” é iniciada por sinais externos à célula, como radicais livres, agentes químicos, físicos ou biológicos que vão estimular os receptores da superfície celular. Os receptores de morte são proteínas da família transmembrana tipo I, caracterizados pela presença de repetições ricas em cisteína no domínio extracelular e pelo módulo de interação proteína-proteína conhecido como domínio de morte (DD) (Fig. 2). Os membros da família de receptores de morte incluem o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1 – também conhecido como DR1, CD120a, p55 e p60), Fas (também conhecido como DR2, APO-1 e CD95), DR3 (também conhecido como APO-3, LARD, TRAMP e WSL1), receptor relacionado ao ligante indutor de apoptose TNF 1 (TRAILR1 – também conhecido como DR4 e APO-2), TRAILR2 (também conhecido como DR5, KILLER e TRICK2), DR6, receptor ectodisplasina A (EDAR) e receptor do fator de crescimento do nervo (Lavrik et al., 2005).

A ligação ao receptor de morte do ligante (como por exemplo o receptor Fas e seu ligante FasL), cliva a pró-Caspase 8 que forma Caspase 8, a forma ativa dessa proteína iniciadora, que ativa a Caspase 3, que é uma caspase efetora que ativa endonucleases que iniciam o processo de clivagem do DNA (Chang e Yang, 2000). (Fig. 3).

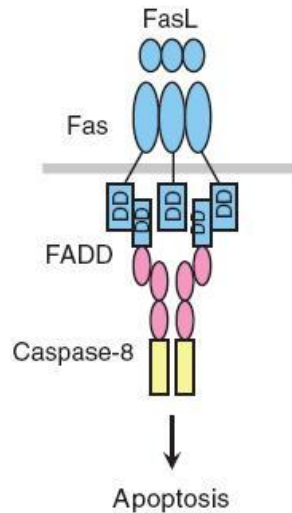


FIGURA 2 – Domínio de morte (DD) do receptor Fas recruta a proteína adaptadora FADD, que via seu domínio efetor de morte (DED), recruta e ativa Caspase 8. (Fonte: J. Li and J. Yuan, Caspases in apoptosis and beyond, 2008, Oncogene, v. 27, 6194–6206).

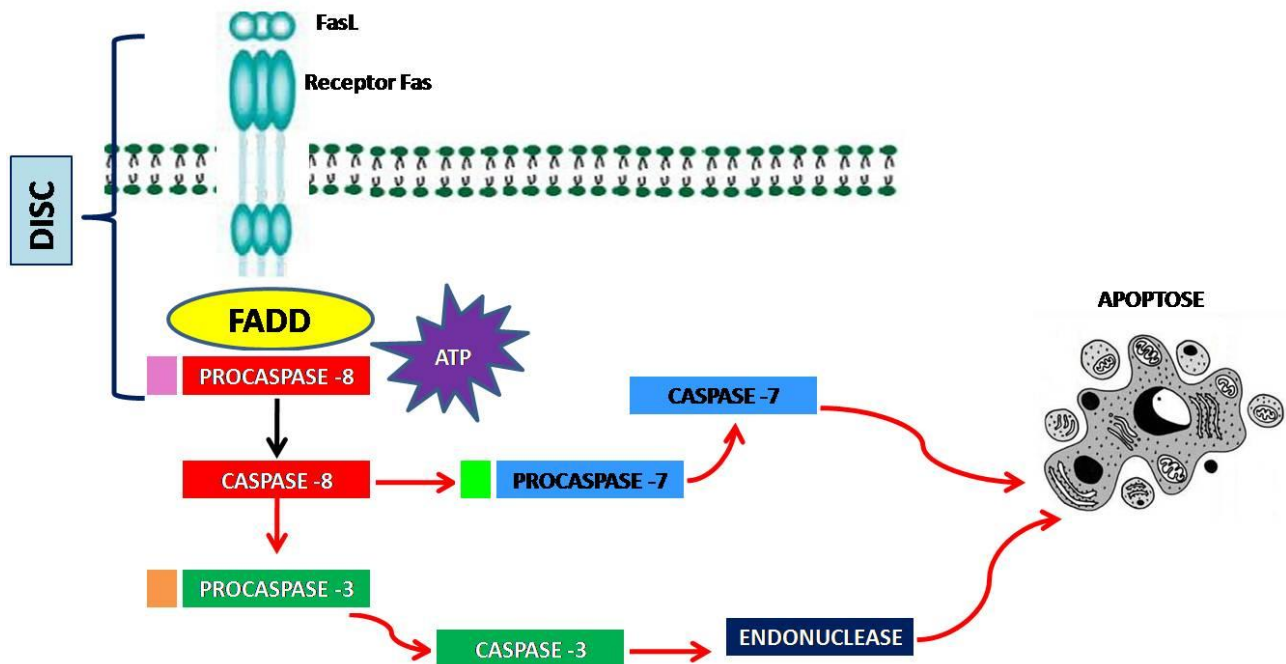


FIGURA 3 – Via de ativação das caspases. Representação esquemática da via extrínseca. Complexo sinalizador de

indução de morte (DISC). (Fonte: Del Puerto H. L. Mecanismos envolvidos na Apoptose induzida pelo vírus da cinomose canina in vivo, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p. 28, 2010.)

A via intrínseca da apoptose, ou via mitocondrial, é ativada em resposta a vários tipos de estresse intracelular, incluindo a falta de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse no retículo endoplasmático, dentre outros. O estresse celular leva a alterações morfofuncionais da mitocôndria com liberação do citocromo C, que acoplado à molécula adaptadora (Apaf - fator de ativação da apoptose), irá ativar a pró-Caspase 9, formando o apoptossomo, um complexo apoptossômico, responsável pela ativação da Caspase 9 que ativará a pro-Caspase 3 (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000) (Fig. 4). A família de proteínas Bcl-2 consiste de membros anti-apoptóticos (ex. Bcl-2) e pró-apoptóticos (ex.: Bax, Bim) que determinam a sobrevivência ou morte para a célula (Tsujimoto e Shimizu, 2000). Bax é um membro pró-apoptótico que forma homo e heterodímeros. A dimerização de Bax resulta em sua translocação (Gross et al., 1998) e inserção na membrana mitocondrial (Suzuki et al., 2000) com consequente disfunção mitocondrial e liberação dos fatores apoptóticos, como citocromo C (Fig. 4). Esses fatores induzem a cascata proteolítica das caspases, condensação da cromatina, e fragmentação do DNA, levando a morte celular (Adams, 2003; Cory et al., 2003; Wang, 2001). O fator de indução da apoptose (AIF) e a proteína Diablo (SMAC Diablo) são outros fatores mitocondriais que também vão levar a ativação da apoptose (Schultz et al., 2000).

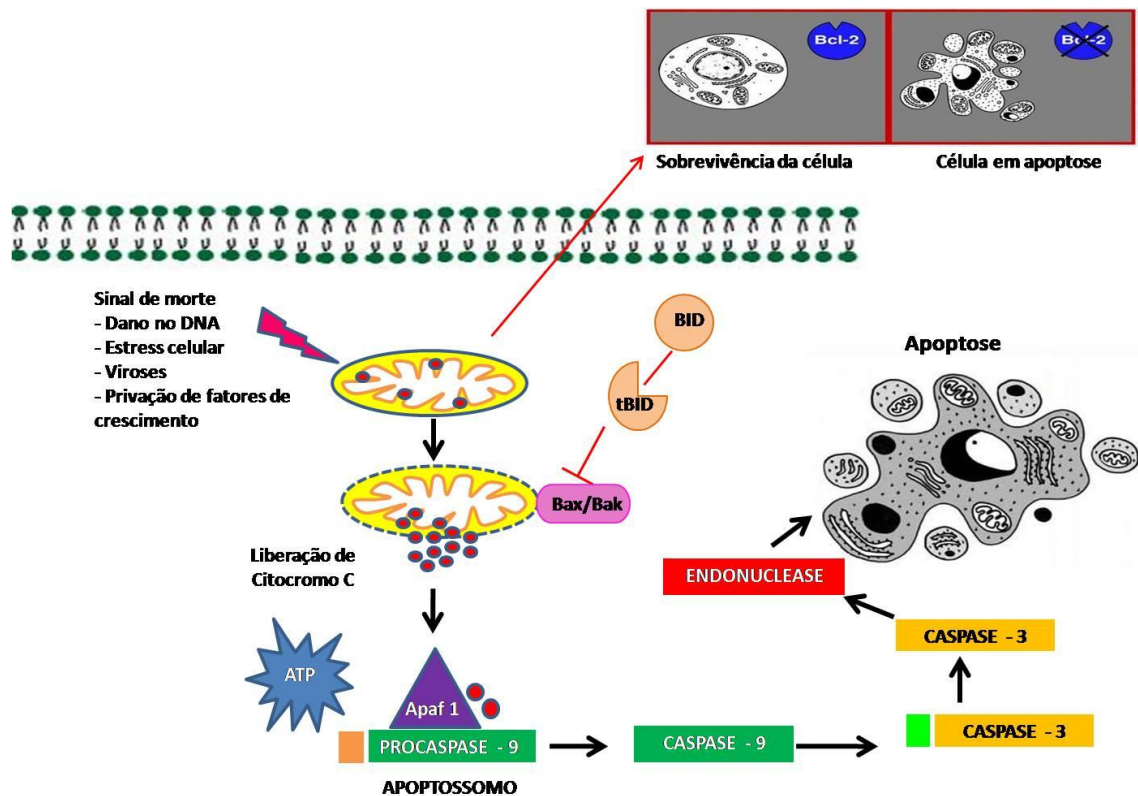


FIGURA 4 – Via de ativação das caspases. Representação esquemática da via intrínseca. Diversos estímulos ou a ativação de proteínas, alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando a liberação de citocromo c para o citosol e a formação do apoptossomo. Caspase 9 ativa propaga a cascata proteolítica de eventos futuros de ativação de caspases efetoras. (Fonte: Del Puerto H. L. Mecanismos envolvidos na Apoptose induzida pelo vírus da cinomose canina in vivo, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p. 28, 2010.)

Para melhor compreensão da apoptose é importante entender o mecanismo de ativação deste processo, bem como a cascata de proteínas específicas a ele relacionado. A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias: A Bcl-2 e as Caspases (Adams, 2003; Alison e Sarraf, 1992).

Proteínas Bcl-2

Esta família está subdividida em dois grupos: pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria; e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático (Mignotte e Vayssiere, 1998; Petit et al., 1997). O balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas é o que determina se a célula entrará ou não em apoptose (Spanos et al., 2002).

Estas proteínas estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, porém também podem estar envolvidas na ativação das Caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente bloqueando as Caspases, e indiretamente impedindo a liberação de citocromo C (Mignotte e Vayssiere, 1998). O citocromo C é uma importante proteína que participa da ativação da apoptose via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Mignotte e Vayssiere, 1998).

O AIF (Fator de indução apoptótico) também é liberado pela mitocôndria, translocando-se para o núcleo e induzindo a condensação e a fragmentação nuclear (Chang e Yang, 2000).

Caspases

As caspases são proteases que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos, desencadeando a apoptose (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000). Estas proteases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas

(caspases) somente quando a célula recebe sinal de morte (Li e Yuan, 2008).

Dentre as caspases efetoras, a Caspase 3 foi identificada como sendo uma protease que inativa a poli ADP ribose polimerase (PARP). A PARP atua no núcleo catalizando a ribosilação do ADP de histonas e de outras proteínas envolvidas no reparo do DNA. Uma das hipóteses é que a clivagem e a inativação desta proteína levam a uma injúria letal do DNA, contribuindo para o mecanismo de apoptose. Além disso, foi demonstrado que células anucleadas, bem como células deficientes em PARP e outras proteínas de reparo, são capazes de sofrer morte celular programada apresentando sinais morfológicos clássicos de apoptose (Chang e Yang, 2000).

A fragmentação do DNA também é realizada por intermédio do complexo Fator de fragmentação do DNA, ou complexo Dnase regulado pela Caspase 3 (DFF). O DFF está presente na célula na forma inativa, formado pela subunidade inibitória (ICAD) e ativa (CAD). A pró-Caspase 3, ativada pelo apoptossomo (Apaf + citocromo C + Caspase 9) é responsável pela degradação do ICAD liberando a porção ativa do DFF, o qual no núcleo realiza a degradação e a condensação do DNA (Chang e Yang, 2000; Zhang et al., 2004). Proteínas do citoesqueleto também são clivadas pela Caspase 3, produzindo alterações celulares típicas da apoptose, como a formação de "blebbings" e corpos apoptóticos (Chang e Yang, 2000; Saraste, 1999; Zhang et al., 2004).

Apoptose na maturação e liberação da placenta

Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenham papel importante na função placentária. Ambos os processos são inversamente proporcionais ao longo da gestação (Boos et al., 2003). Segundo Smith et al. (1997), a apoptose atinge células de todos os tipos na placenta humana. A sua ocorrência aumenta

consideravelmente no terço final da gestação (Boos et al., 2003; Smith et al., 1997). Nesse caso, a apoptose parece estar relacionada com o mecanismo de remodelação placentária auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais (Smith et al., 1997).

Fisiologicamente, a apoptose possibilita a eliminação de células desnecessárias a fim de se manter a homeostase tecidual (Wöhrl e Häcker, 1999). Nos momentos que antecedem o parto a placenta precisa já estar hipocelularizada para que seja liberada normalmente (Barreto Filho e Marques Júnior, 1993). Vacas com retenção placentária apresentam um aumento de células epiteliais maternas (Santos e Marques Júnior, 1998). Estudos morfológicos demonstraram que a maturação placentária está relacionada com a diminuição da população celular dos tecidos fetal e materno no placentomo (Barreto Filho; Marques Júnior, 1993; Malard et al., 1996; Marques Júnior, 1988; Santos, 1995; Santos et al., 1997) e com a ocorrência de apoptose (Martins, E., 1999; Martins, V. M. V., 1999).

A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para a maturação, quanto para a liberação normal da placenta após o parto (Martins, E., 1999; Martins et al., 2004; Martins, V. M. V., 1999). Martins, E. (1999) supôs que as mudanças hormonais envolvidas com o parto estimulariam a apoptose nas células trofoectodermis e maternas, uma vez que a apoptose é mais intensa no momento do parto. Além disso, observou-se que o número de células apoptóticas em placentomos de vacas que pariram e liberaram normalmente a placenta foi significativamente maior do que nas que tiveram parto a termo com RP.

Contrariamente, Boos et al., (2003) encontraram maior número de células apoptóticas em placentomos de vacas que apresentaram RP. Possivelmente, o achado de Boos et al., (2003) tenha sido diferente em decorrência da técnica de marcação utilizada na contagem de células e corpos apoptóticos, uma vez que os autores

utilizaram-se da reação de TUNEL. A reação de TUNEL não deve ser utilizada na quantificação de apoptose, uma vez que dá muito falso negativo, principalmente em alguns tecidos, tais como a placenta. Martins, E. (1999) e Martins, V. M. V. (1999) utilizou a coloração de HE, baseando-se nos aspectos morfológicos de apoptose, para a quantificação. Além disso, a apoptose foi também investigada via teste imunoenzimático ELISA e eletroforese de DNA em gel de agarose, corroborando a avaliação microscópica.

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

Isso permiti inferir a apoptose, como mecanismo de redução da celularidade placentária durante o processo de maturação e preparação para o parto, o que justifica o estudo dos mecanismos da apoptose para elucidar as vias de ativação envolvidas neste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM S, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* v. 17, p. 2481-95, 2003.

ALISON M. R. AND SARRAF C. E. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *J R Coll Physicians Lond.* V. 26, p. 25-35, 1992.

AMOROSO, E. C. Placentation. In: PARKES, A. S. *Marshall's physiology of reproduction*, 3 ed. London: Longmans Green, 1952, p. 127-311.

BARRETO FILHO, J. B., MARQUES JUNIOR, A. P. Aspectos

histológicos da placenta de vacas zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 45, n. 4, p. 385-393, 1993.

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

BJORKMAN, N. *An atlas of placental fine structure*. London: Baillière Tindall & Cassel, 1970. 96p.

BORSBERRY, S., DOBSON, H. Periparturient diseases and their effects on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.*, v. 124, n. 9, p. 217-219, 1989.

BOOS, A.; JANSSEN, V.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 469-480, Oct. 2003

CURTIS, C.R., ERB, H.N. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.2347-2360, 1985.

DARZYNKIEWICZ Z., JUAN G., LI X., GORCZYCA W., MURAKAMI T. AND TRAGANOS F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. v. 27, p. 1-20, 1997.

DONOVAN M. AND COTTER T. G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*. v. 1644, p. 133-47, 2004.

EILER, H. Retained placenta. In: ROBERT S. YOUNGQUIST, (ed.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 340-348, 1997.

ERB, H.N., MARTIN, S.W., ISON, N. SWAMINATHAN, S. Interrelationship between production and reproductive diseases in holstein cows, path analysis. *J. Dairy Sci.*, v.64, p.282-289, 1981

GROSS, T. S., WILLIAMS, W. F. The fetal placental binucleate

cell as a regulator of placental prostaglandin synthesis. *Biol. Reprod.*, v. 34, suppl. 1, p. 77, 1986.

GROSS, T. S., WILLIAMS, W. F., MORELAND, T. W. Prevention of the retained fetal membrane syndrome (retained placenta) during induced calving in dairy cattle. *Theriogenol.*, v. 26, n. 3, p. 365-370, 1986.

GROSS, T. S., WILLIAMS, W. F., MANSPEACKER, J. E. *In vitro* placental prostaglandin synthesis in the late pregnant and peripartum cow. *Biol. Reprod.*, v.32, Suppl.1, p.154, 1985.

GRUNERT, E. Placental separation/retention in the bovine. In: *Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, v.10, p. 17-24, 1984.

GRUTTER M. G. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* v.10, p. 649-55, 2000.

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

HOLM, L. W., SALVATORE, C., ZEEK-MINING, P. The histology of the postterm bovine placenta. *Am. J. Obst. Gynecol.*, v. 83, p. 479-486, 1964

JAINUDEEN, M. R., HAFEZ, E. S. E. Gestation, Prenatal Physiology, and Parturition. In: HAFEZ, E. S. E. (ed.). *Reproduction in Farm Animals*, 6 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 213-236, 1993

JEFFREY, J. J., EHLICH, L. S., ROSWIT, W. T. Serotonin: An inducer of collagenase in miometrial smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.*, v. 146, n. 3, p. 399-406, 1991.

KERR J. F. A personal account of events leading to the definition of the apoptosis concept. *Results Probl Cell Differ.* v. 23, p. 1-10, 1999.

KERR J. F. AND SEARLE J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain

numerous mitotic figures. *J Pathol.* v. 107, p. 41-4, 1972.

KING, G. J., ATKINSON, B. A., ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 31, p. 17-30, 1982.

LI J. AND YUAN J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* v. 27, p. 6194-206, 2008.

MALARD, P.F., BARRETO FILHO, J.B., SANTOS, R.L., MARQUES JUNIOR, A.P. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas zebu ao longo da gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.48, n.5, p.553-558, 1996.

MARQUES JÚNIOR, A. P. *Leucocyte chemotaxis activity by cotyledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta.* 1988. 182p. Tese (PhD). University of Illinois, Urbana.

MARQUES JÚNIOR, A. P., BARRETO FILHO, J. B., SATURNINO, H. M. Aspectos morfométricos da placenta de vacas zebu (*Bos taurus indicus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 45, n.2, p.213-219, 1993

MARTINS, E. *Apoptose na maturação e eliminação placentária em Bos taurus taurus.* 1999. Tese. (Dr.).134p. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

RAMSEY, E. M. *The placenta - human and animal.* New York: Praeger Publishesr,p. 187, 1982

SANTOS, R. L. *Estudo morfológico da placenta de vacas leiteiras com liberação normal e com retenção.* 1995. Dissertação. (Mestre). 102p. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, R.L., MARQUES JUNIOR, A.P., BARRETO FILHO, J.B. Morphometric analysis of collagen in placentomes of dairy cows with normal delivery and with placental retention. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.34, n.3, p.240-242, 1997.

STEVEN, D. H., MORRIS, G. Development of the foetal membranes. In: STEVEN, D. H. *Comparative placentation.* London:

Academic press, p. 58-86, 1975.

VAN WERVEN, T., SCHUKKEN, Y.H., LLOYD, J., BRAND, A., HEERINGA, H.Tj., SHEA, M. The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate. *Theriogenol.*, v. 37, p. 1191-1202, 1992.

WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* v. 15, p. 2922-33, 2001.

WANGO, E. O., HEAP, R. B., WOODING, F. B. P., Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.*, v. 94, n. 1, p. 203 -211, 1992.

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

WOICKE, J., SCHOON, H. A., HEUWIESER, W. et. al. Morphological and functional aspects of placental maturation mechanisms in the cow. I. Light microscopy. *J. Vet. Med. Assoc.*, v. 33, n. 9, p. 660 - 667, 1986.

WOHRL, W., HÄCKER, G. Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.254, p.552-558, 1999.

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

ZHANG C. L., WU L. J., TASHIRO S., ONODERA S. AND IKEJIMA T. Oridonin induces apoptosis of HeLa cells via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway. *Acta Pharmacol Sin.* v. 25, p. 691-8, 2004.

CAPÍTULO II

APOPTOSE E EXPRESSÃO DE BCL-2 E DAS CASPASES 3 E 8 EM PLACENTA BOVINA, EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE GESTAÇÃO

K.K.O.L. Meça, A.S. Martins, H.L. Del Puerto, A.C. Vasconcelos Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estágios de gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.2, p.258-264, 2010

2010

Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação

[Apoptosis and expression of Bcl-2 and caspases 3 and 8 in placenta of cows at different pregnancy stages]

K.K.O.L. Meça, A.S. Martins, H.L Del Puerto, A.C. Vasconcelos

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Caixa Postal 2486
31270-010 – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Apoptose e seus mecanismos reguladores são eventos fisiológicos cruciais para a manutenção da homeostase placentária, e o desequilíbrio desses processos pode comprometer a função placentária e, conseqüentemente, o sucesso da gravidez. Neste estudo, investigou-se a apoptose utilizando-se histomorfometria em lâminas coradas em HE e submetidas à reação de TUNEL. Além disso, avaliou-se a expressão de Bcl-2 e das caspases 8 e 3, pela reação de polimerase em cadeia em tempo real, em placentas saudáveis em diferentes estádios de gestação. Amostras de placentônios de vacas com quatro, seis e nove meses de gestação foram colhidas e processadas. O índice apoptótico aumentou progressivamente com o avanço da gestação. Tanto o Bcl-2 quanto as caspases 3 e 8 foram expressas nos três períodos estudados, sendo a expressão de Bcl-2 menor que a de caspase 8, que é menor que a de caspase 3. Estes resultados indicam que essas moléculas estão envolvidas na via apoptótica ativada na maturação placentária, exibindo um padrão de expressão ao longo da gestação e contribuindo para o equilíbrio fisiológico da celularidade e renovação celular na placenta bovina.

Palavras-chave: bovino, apoptose, placenta, caspases, Bcl-2

ABSTRACT

Apoptosis and its regulating mechanisms are crucial physiological events for the maintenance of the placental homostasis; and disequilibrium of these processes may compromise placental function and the success of the pregnancy. In this study, apoptosis was investigated by histomorphometry using slides stained with HE and TUNEL reaction. Besides that, Bcl-2 and caspases 8 and 3 expression were evaluated by real time polymerase chain reaction in healthy placentas under different gestacional ages. Samples of placentones of cows at 4th, 6th, and 9th months of gestation were harvested and processed. The apoptotic index gradually increased with the advance of the gestation. Bcl-2 and caspases 3 and 8 were expressed in all the studied periods, being the expression of Bcl-2 lower than that of caspase 8, which was lower than caspase 3. These results indicate that these molecules are involved in the activated apoptotic way in the placental maturation, showing a standard expression throughout the gestation and contributing for the physiological balance of the cellularity and cellular turn over in bovine placenta.

Keywords: cattle, apoptosis, placenta, caspases, Bcl-2

INTRODUÇÃO

A apoptose é um tipo de morte celular importante no mecanismo fisiológico de controle da celularidade dos tecidos, por exercer um papel oposto ao da mitose (Raff, 1992; Vasconcelos e Lam, 1995). Fisiologicamente, a apoptose

possibilita a eliminação de células não necessárias para a manutenção da homeostase (Wöhrl e Häcker, 1999).

Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenham papel importante na função placentária. Ambos os processos são

Recebido em 19 de novembro de 2009
Aceito em 6 de abril de 2010
E-mail: karinameca@yahoo.com.br

inversamente proporcionais ao longo da gestação (Boos et al., 2003). Segundo Smith et al. (1997), a apoptose atinge células de todos os tipos na placenta humana. A família das proteínas Bcl-2 desempenha um papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas. Algumas dessas proteínas, como Bcl-2 e bcl-XL, bcl-w, mcl-1 e A1 são antiapoptóticas, enquanto outras, como a bax, bad e bid são pró-apoptóticas (Thompson, 1999). Muitas das mudanças que ocorrem nas células em apoptose são mediadas por uma cascata enzimática que envolve cisteíno-proteases, chamadas caspases, que clivam resíduos de ácido aspártico (Hengartner, 2000). Atualmente, já foram identificadas 14 caspases (Abbas et al., 2000) que podem ser classificadas em iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e executoras (3, 6 e 7) (Amarante-Mendes e Green, 1999).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver iniciadores específicos de oligonucleotídeos para transcrição reversa e amplificação de regiões-alvo dos mRNAs das caspases 3 e 8 e de Bcl-2, otimizar um protocolo de RT-PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão desses genes em placenta de vacas em diferentes estádios de gestação e comparar com o índice apoptótico obtido por meio da histomorfometria em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina e pela reação de TUNEL.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 15 placentas de vacas mestiças provenientes do Frigorífico Alvorada, situado no município de Igarapé, MG. Essas amostras foram divididas em três grupos (n = 5): o grupo 1 foi formado por placentônios obtidos de vacas com quatro meses de gestação; o grupo 2 por placentônios de vacas com seis meses de gestação e o grupo 3 por placentônios de vacas com nove meses de gestação. A estimativa da idade fetal foi calculada pelo comprimento craniocaudal (CRL) do feto (Noakes, 1990). As amostras dos placentônios foram processadas histologicamente e para extração de RNA. Lâminas com seções de 5µm foram coradas em HE para determinação do índice apoptótico e submetidas à reação de TUNEL, que marca *in situ* as extremidades 3'-OH do DNA genômico fragmentado no processo de apoptose. Determinou-se o índice apoptótico (IA= somatório das células com morfologia de

apoptose/somatório das células totais x 100). Os campos foram contados em objetiva planacromática de 40x. Na quantificação do IA, foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentaram pelo menos três dos critérios morfológicos de inclusão (Vasconcelos, 2001).

A extração de RNA total foi realizada segundo a técnica descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Após verificação da integridade do RNA das amostras por meio de eletroforese em gel de agarose, suas concentrações foram determinadas pela leitura da densidade óptica (*GeneQuant*). Os oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados com base na análise de homologia entre as sequências dos mRNAs codificadores das caspases 3 e 8, do Bcl-2 e do s26 no GeneBank, obtidas por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). A reação da transcrição reversa (RT) foi realizada de acordo com Martins et al. (1995). *Pools* de RNA de cada grupo foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Para verificação da eficiência e da especificidade dos *primers* para caspases 3 e 8, Bcl-2 e s26 selecionados para PCR em tempo real, utilizouse a PCR convencional (Saiki et al., 1985) em termociclador *MJ Research Minicycler*. Para a verificação dos *amplicons*, utilizaram-se alíquotas de 3µl da PCR na eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata. Com o objetivo de se obter um fragmento de PCR puro e específico para quantificação e utilização como padrão na PCR em tempo real, foi feita a purificação dos *amplicons* alvos de Bcl-2, caspase 3 e 8 e s26, por meio de gel-purificação por eletroeluição. Para a reação de PCR, em tempo real foi utilizado o *kit* SYBR GREEN PCR core Reagents da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Utilizou-se um protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagente no volume final de reação de 25µl. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação da PCR em tempo real foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 SDS. Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, uma curva-padrão de todos os *amplicons* purificados foi construída com base nas diluições seriadas. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real, foi realizada uma curva de

dissociação como parte do programa estabelecido no ABI Prism 7000 SDS. Os fragmentos amplificados foram posteriormente visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apoptose foi facilmente reconhecida morfológicamente em todos os campos microscópicos de todas as amostras processadas. Características peculiares do processo de apoptose tais como anoiquia, condensação da cromatina nuclear (formação de crescentes), retração citoplasmática e fragmentação nuclear e/ou citoplasmática (caracterizando a formação de corpos apoptóticos) foram observadas. A morte celular por apoptose desenvolveu-se na ausência de inflamação, que é característico da apoptose (Leist e Nicotera, 1998). O índice apoptótico do grupo com nove meses de gestação foi maior, $48,5 \pm 3,08$, que o do grupo com seis meses, $34,78 \pm 3,97$, que, por sua vez foi maior que o do grupo com quatro meses de gestação, $15,01 \pm 2,11$, com $P < 0,0001$ (Fig. 1). Assim, o índice apoptótico aumentou com o avanço do estágio de gestação, semelhante aos resultados de estudos anteriores (Boos et al., 2003; Straszewski-Chavez et al., 2004). A apoptose ocorre na placenta em toda a gestação, mas com maior frequência no período final, em relação ao primeiro trimestre (Straszewski-Chavez et al., 2004), isto é, sua ocorrência aumenta consideravelmente no terço final da gestação (Boos et al., 2003). Nesse caso, a apoptose parece estar relacionada ao mecanismo de remodelação placentária, auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais (Smith et al., 1997). Nos momentos que antecedem o parto, a placenta precisa já estar hipocelularizada para que seja normalmente liberada (Barreto Filho e Marques Júnior, 1993). Vacas com retenção placentária apresentam aumento de células epiteliais maternas (Santos e Marques Júnior, 1998). Estudos morfológicos demonstraram que a maturação placentária está relacionada à diminuição da população celular dos tecidos fetal e maternos no placentônio (Santos et al., 1997). A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para a maturação, quanto para a liberação normal da placenta após o parto (Martins et al., 2004).

A apoptose nas células placentárias foi também demonstrada por meio da técnica de TUNEL (Fig. 2). Essa técnica confirma a apoptose pela marcação *in situ* da fragmentação do DNA genômico (Gavrieli et al., 1992; Sanders e Wride, 1996). Quase todas as células marcadas exibiam morfologia característica da apoptose. Poucas células com morfologia característica da apoptose não estavam marcadas, e isso é atribuído às ligações proteicas cruzadas, formadas durante o processo de fixação tecidual, que diminui a sensibilidade do TUNEL (Gold et al., 1994). Negoescu et al. (1996) e Labat-Moleur et al. (1998) sugeriram que na reação de TUNEL deve-se considerar também os aspectos morfológicos e não somente a marcação indicativa da fragmentação do genoma. Para Kerr et al. (1972), a morfologia característica da apoptose, evidenciando a condensação da cromatina com retração das células e a fragmentação citoplasmática em corpos apoptóticos, é suficiente para a indicação histológica da apoptose.

O RNA total mensurado por espectrofotometria variou de 1,7 a 10,4 μg por amostra, como esperado, segundo Chomczynski e Sacchi (1987). As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260 para ácido nucleico e 280 para contaminantes proteicos demonstraram uma razão próxima de 1,8, isto é, a qualidade do RNA obtida estava de acordo com as exigências vigentes para biologia molecular. Essas amostras foram consideradas viáveis para a etapa seguinte de transcrição reversa e PCR.

Os oligonucleotídeos designados para RT-PCR foram, Bcl-2: BCL2-F= 5'-CTTCTGGCTGTGGCGACCCAGAT-3' e BCL2-R= 5'-CCACGGAGTACAGGGACACAACCTT-3', amplicon de 74pb; caspase 8: CASP8-F= 5'-ACAAGGCATCATCTATGGCTCCGA-3' e CASP8-R=5'-CCAGTGAAGTAAGAGGTCAGCTCAT-3', amplicon de 70pb; caspase 3: CASP3-F = 5'-TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG -3' e CASP3-R= 5'-TCTGACAGGCCATG TCATCCTCA -3', amplicon de 86pb. Para normalização das concentrações de mRNA expresso nos tecidos analisados por PCR em tempo real, utilizou-se o par de *primers* para o *s26*: S26BT-F= 5'-CTTCCAAGC TGTATGTGAAACTAC-3' e S26BT-R= 5'-CGATTCCGACTACCTTGCTGTGA, amplicon de 75pb. Os *primers* foram criteriosamente selecionados para a RT PCR em tempo real

levando-se em consideração regiões com conteúdo satisfatório de GC e número de nucleotídeos, e com Tm permitido. As seqüências escolhidas para confecção dos oligonucleotídeos iniciadores foram pesquisadas no Blastn para garantir a exclusão de regiões homólogas com os alvos pesquisados. A utilização da região de junção para *splicing*, contendo um intron, na seleção dos *primers* reduz a possibilidade de influência de possíveis contaminações por DNA genômico das preparações de RNA total durante a amplificação (Ausubel, 1995). A contaminação por DNA genômico poderia interferir na etapa de PCR, posterior à transcrição reversa, levando a uma falsa interpretação da expressão do mRNA reverso-transcrito. Portanto, a estratégia utilizada reduz a possibilidade de amplificação inespecífica de DNA genômico, e isso permitiu a obtenção de fragmentos puros e específicos para os genes escolhidos.

As curvas-padrão para Bcl-2 (Fig. 3A), caspase 3 (Fig. 3B) e 8 (Fig. 3C) foram obtidas pela reação da PCR em tempo real, o amplicon de cada um foi amplificado em duplicata a partir do cDNA

de tecido placentário e apresentou a clássica curva logarítmica. Estes dados demonstram que a expressão de cada amostra pode ser quantificável. Além disso, os resultados das curvas de dissociação para Bcl-2 (Fig. 4A), caspase 3 (Fig. 4B) e 8 (Fig. 4C) confirmam a pureza, a qualidade, o tamanho e a especificidade dos fragmentos amplificados pelo PCR em tempo real. As curvas foram realizadas como parte do programa estabelecido no ABI Prism 7000 SDS para todos os fragmentos. O *amplicon* para Bcl-2 e caspases 3 e 8, obtido após eletroeluição do fragmento de PCR convencional, foi utilizado para a construção das curvas. Os resultados das curvas de calibração para Bcl-2 (Fig. 4A), caspase 3 (Fig. 4B) e 8 (Fig. 4C) demonstraram boa qualidade de pipetagem, diluição, sensibilidade e reprodutibilidade. Os resultados das duplicatas foram altamente fiéis. Pode-se observar, nessas figuras, que o Ct (total de ciclos) foi perfeitamente mantido, logaritmicamente, com as diluições do padrão. Este resultado é fundamental para quantificações absolutas (Fig. 5) da expressão desses genes em placenta de vaca.

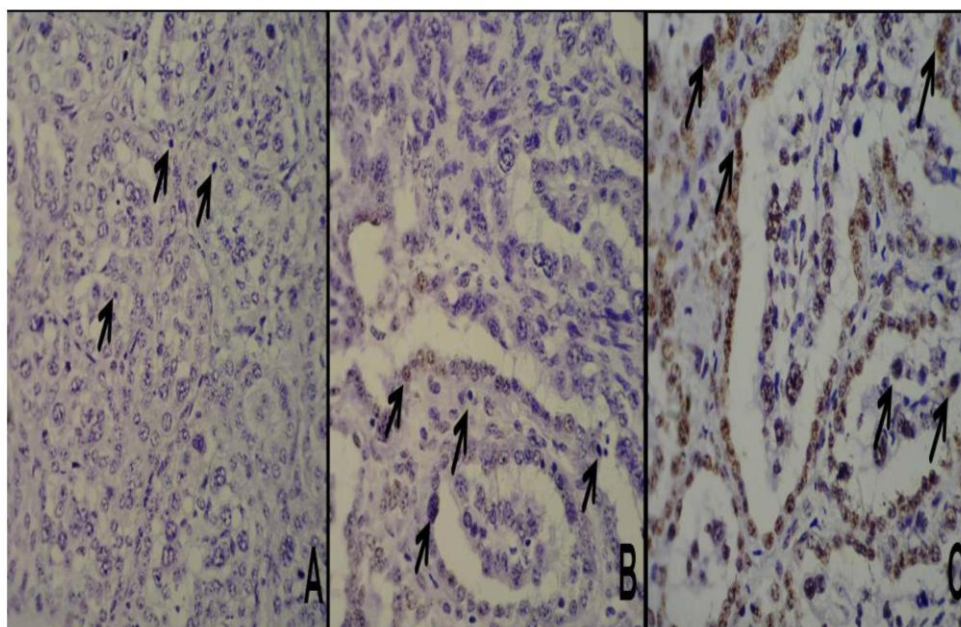


Figura 1. Placenta de vaca mostrando células em apoptose (setas). (A) Placenta com quatro meses de gestação. (B) Placenta com seis meses de gestação. (C) Placenta com nove meses de gestação. (TUNEL, Barra = 10µm).

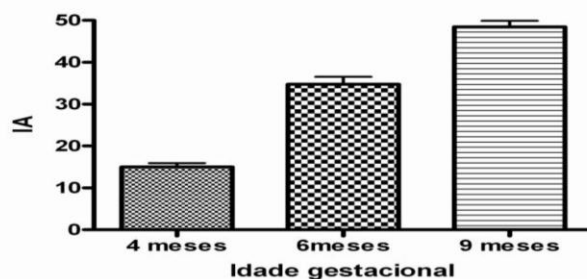


Figura 2. Crescimento progressivo do índice apoptótico com o avanço da gestação. Houve diferença significativa entre os meses.

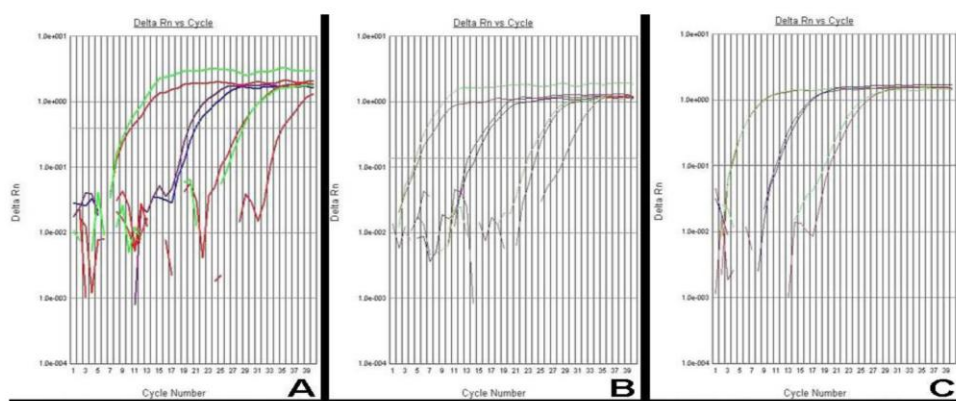


Figura 3. Quantificação da expressão dos genes pela PCR em tempo real, curva de calibração com curvas de amplificação refletindo diferentes quantidades iniciais de cDNA para Bcl-2 (A), caspase 3 (B) e caspase 8 (C), e variação de $1\text{ng a } 1 \times 10^{-9}\text{ng}$.

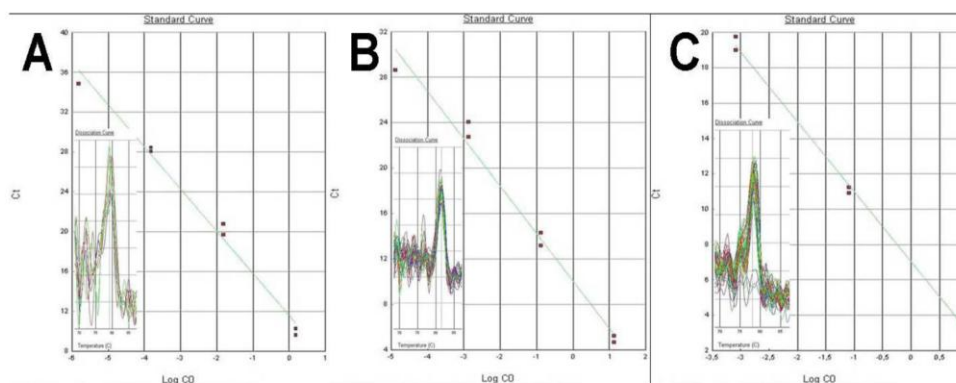


Figura 4. Eficácia da RTPCR do Bcl-2 (A) e das caspases 3 (B) e 8(C): valor de 100%, obtida pela equação $E=10^{-1/\text{slope}}$. (A) A inclinação e a alta linearidade são demonstradas pelo slope e R^2 . As curvas de dissociação apresentadas no detalhe abaixo e à esquerda demonstram as temperaturas de fusão (T_m) e a pureza dos fragmentos gerados neste ensaio com vacas. (A) Bcl-2: slope= -4,244; $R^2=0,987$ e $T_m= 79,2^\circ\text{C}$. (B) caspase 3: slope= -4,176; $R^2=0,983$ e $T_m= 81,5^\circ\text{C}$. (C) caspase 8: slope= -3,944; $R^2=0,997$ e $T_m= 78,0^\circ\text{C}$.

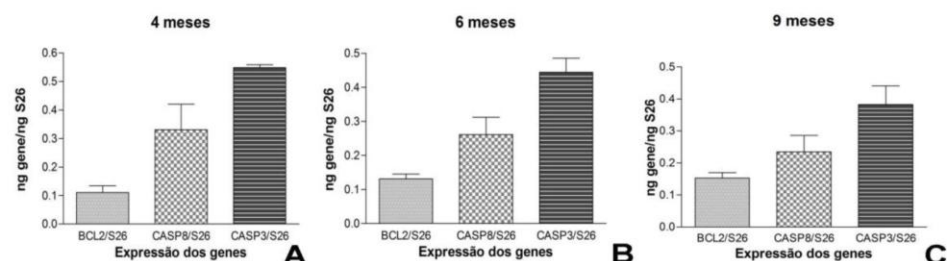


Figura 5. Expressão absoluta do Bcl-2 e das caspases 3 e 8, com 4, 6 e 9 meses de gestação de vacas. Houve diferenças significativas.

A amplificação do Bcl-2 e das caspases 3 e 8 indica sua participação no processo de apoptose em todos os estádios gestacionais estudadas. Segundo Patel e Gores (1998), os principais antagonistas da apoptose, Bcl-2 e bcl-XL, localizam-se, principalmente, na membrana mitocondrial. Essas proteínas são capazes de formar poros condutores de íons em membranas sintéticas (Thompson, 1999). Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais elas mantêm a homeostasia celular seja o de regulação da permeabilidade das membranas nas quais se distribuem. Demonstrou-se que a Bcl-2 bloqueia a penetração nuclear de perfurina e granzima, substâncias liberadas pelos linfócitos T citotóxicos contra seus alvos e que podem ser ativadoras de caspases (Kerr et al., 1972).

Um dos principais passos da via de suicídio celular é a ativação das caspases, as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. Porém, a apoptose pode também ocorrer independentemente da ativação de caspases (Donovan e Cotter, 2004). As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico (Thompson, 1999).

Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase 8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros, como a caspase 3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (Patel e Gores, 1998). Os substratos das caspases incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na

sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando à desestruturação da célula (Kerr et al., 1972; Thompson, 1999). A ausência ou a exacerbação do fenômeno de apoptose podem resultar em consequências desastrosas para os tecidos (Miller e Marx, 1998).

A PCR em tempo real demonstrou que o Bcl-2 e as caspases 3 e 8 foram expressos nos três meses estudados, sendo a expressão de Bcl-2 menor que a de caspase 8, que é menor que a de caspase 3, apresentando o mesmo padrão (Fig. 5). Estes dados indicam que essas enzimas estão envolvidas na via apoptótica ativada na maturação placentária, exibindo um padrão de expressão ao longo da gestação.

CONCLUSÕES

Na placenta bovina, o Bcl-2 e as caspases 3 e 8 participam do processo da apoptose nas três idades gestacionais estudadas, quatro, seis e nove meses. Essas enzimas estão envolvidas na via apoptótica ativada no desenvolvimento placentário, participando da maturação e exibindo um padrão de expressão ao longo da gestação. Esses achados reforçam e acrescentam novos dados ao papel da apoptose na manutenção do equilíbrio fisiológico e na maturação da placenta bovina.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. cap.10, p.208-231.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulator apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1053-1061, 1999.
- AUSUBEL, F.A. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons, 1995. v.2.
- BARRETO FILHO, J.B.; MARQUES Jr., A.P. Histological aspects of the placenta of zebu cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.45, p.385-393, 1993.
- BOOS, A.; JANSSEN, V.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*, v.126, p.469-480, 2003.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.
- DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Bioch. Biophys. Acta*, v.1644, p.133-147, 2004.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, v.119, p.493-501, 1992.
- GOLD, R.; SCHMIED, M.; BREITSCHPF, H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.*, v.71, p.219-227, 1994.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v.407, p.770-776, 2000.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v.26, p.239-257, 1972.
- LABAT-MOLEUR, F.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, v.46, p.327-334, 1998.
- LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell Res.*, v.239, p.183-201, 1998.
- MARTINS, A.S.; GREENE, L.J.; YOHO, L.L. et al. The cDNA encoding canine dihydroliipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. *Gene*, v.161, p.253-257, 1995.
- MARTINS, V.M.V.; MARQUES Jr., A.P.; VASCONCELOS, A.C. et al. Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.157-167, 2004.
- MILLER, L.J.; MARX, J. Apoptosis. *Science*, v.281, p.1301, 1998.
- NEGOESCU, A.; LORRIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, v.44, p.959-968, 1996.
- NOAKES, D.E. *Fertilidade e obstetrícia em bovinos*. São Paulo: Varela, 1990. p.25.
- PATEL, T.; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg.*, v.4, p.42-50, 1998.
- RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, v.356, p.397-400, 1992.
- SAIKI, R.K.; SHARF, S.; FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SANDERS, E.J.; WRIDE, M.A. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.*, v.28, p.275-281, 1996.
- SANTOS, R.L.; MARQUES Jr., A.P. Histoquantitative studies of the placentones of milking cows with placental release and retention. *Vet. Not.*, v.4, p.39-42, 1998.
- SANTOS, R.L.; MARQUES JR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B. Morphometric analysis of collagen in placentomes of dairy cows with normal delivery and with placental retention. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.34, p.240-242, 1997.
- SMITH, S.C.; BAKER, P.N.; SYMONDS, E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, v.177, p.57-65, 1997.
- STRASZEWSKI-CHAVEZ, S.L.; ABRAHAMS, V.M.; FUNAI, E.F. et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.*, v.10, p.33-41, 2004.
- THOMPSON, C.B. Apoptosis. In: PAUL, W.E. (Ed.). *Fundamental immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.813-29.
- VASCONCELOS, A.C. *Métodos aplicados ao estudo da Apoptose*. Belo Horizonte: ICB-UFGM, 2001. 17p.
- VASCONCELOS, A.C.; LAM, K.M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, v.112, p.327-338, 1995.
- WOHRL, W.; HÄCKER, G. Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.254, p.552-558, 1999.

CAPÍTULO III

APOPTOSE NA MATURAÇÃO PLACENTÁRIA DE VACAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO: EVIDENCIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E BIOQUÍMICA¹

ARTIGO SUBMETIDO

Trabalho 2104 MF

(Adaptado para PVB)

Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidênciação imunoistoquímica e bioquímica¹

Karina K.O.L. Meça², Helen L Del Puerto², Luciana V. Rodrigues², Milene A. Rachid², Nubia B. Pereira², Márcia G.L. Cândido² e Anilton C. Vasconcelos²

ABSTRACT.- Meça K.K.O.L., Del Puerto H.L., Rodrigues L.V., Rachid M.A., Pereira N.B., Candido M.G.L. & Vasconcelos A.C. 2011. [**Apoptosis in placental maturation of cows in different stages of pregnancy: Immunohistochemical and biochemical evidences.**] Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidênciação imuno-histoquímica e bioquímica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-010, Brazil. E-mail: karinameca@yahoo.com.br

Apoptosis is important for placental homeostasis maintenance, and a misbalance in this process may compromise the success of pregnancy. The aim of this study was to evaluate apoptosis in bovine placental samples at different stages of pregnancy. Placentome samples from 15 healthy cows, at gestational ages of 4 (n=5), 6 (n=5) and 9 (n=5) months were collected and routinely processed for histological and immunohistochemical analysis, and for DNA isolation. Histopath sections were stained with HE. Others were submitted to immunohistochemistry, using pro-apoptotic caspase-3 and Bax protein, and anti-apoptotic Bcl-2 specific antibodies. Isolated DNAs were processed for electrophoresis in agarose gel, for detection of internucleosomal fragmentation. Histomorphometry results demonstrated that apoptotic cells gradually increase with the advance of the gestation. Also, the DNA ladder pattern was observed in all groups. In addition, caspase-3, Bax and Bcl-2 were all expressed in the three different gestation periods. However, caspase-3 presented a higher expression in all groups, in comparison to Bcl-2 and Bax. These results confirm the importance of the apoptosis in the placental maturation. Also, these results indicated that caspase-3, Bcl-2 and Bax are involved in apoptotic activation mechanisms by mitochondrial intrinsic pathway during placental maturation, contributing for physiological cellularity and cellular turn over balance in bovine placenta.

INDEX TERMS: Apoptosis, placenta, caspase 3, Bcl-2, bax, cattle.

¹ Recebido em 30 de outubro de 2010.

Aceito para publicação em.....

² Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-010, Brasil. *Autor para correspondência: karinameca@yahoo.com.br

RESUMO.- Apoptose tem um papel importante na manutenção da homeostase placentária, e o desequilíbrio desse processo pode comprometer a gestação. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de apoptose em amostras de placenta de vacas em diferentes fases de gestação. Amostras de placentomas de 15 vacas saudáveis com 4 (n=5), 6 (n=5) e 9 (n=5) meses de gestação foram colhidas e processadas rotineiramente para a histologia, imuno-histoquímica e isolamento de DNA. As lâminas obtidas foram coradas em HE, ou submetidas à análise imunoistoquímica das proteínas pró-apoptóticas caspase-3 e Bax, e da proteína anti-apoptótica Bcl-2. O DNA isolado foi submetido à eletroforese em gel de agarose para detecção da fragmentação internucleossômica do genoma. Os resultados de histomorfometria revelaram que as células apoptóticas aumentaram progressivamente com o avanço da gestação. Confirmou-se a apoptose pela fragmentação característica do DNA genômico, visualizada pelo clássico “padrão em escada” na eletroforese em gel de agarose. Adicionalmente, a imunexpressão de caspase-3, Bax e Bcl-2 foram observadas em todas as amostras. Entretanto, a proteína caspase-3 apresentou marcação de um maior número de células em todos os tempos gestacionais, quando comparada com a marcação das proteínas Bcl-2 e Bax. Esses resultados confirmam e reforçam a importância da apoptose na maturação placentária. Além disto, indica que caspase-3, Bax e Bcl-2 estão envolvidas nos mecanismos de ativação da apoptose pela via intrínseca mitocondrial ao longo da gestação, contribuindo para o equilíbrio fisiológico da celularidade e renovação celular na placenta bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Apoptose, placenta, caspase 3, Bcl-2, bax, bovinos.

INTRODUÇÃO

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de autodestruição celular dependente de energia e síntese proteica (Kerr & Searle 1972). Está relacionada com a homeostasia na manutenção adequada do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (Gerschenson & Rotello 1992, Kerr 1999). Desta forma, é um tipo de morte desejável, programada e seletiva, que envolve células isoladas sendo regulada intrínseca e extrinsecamente (Mcconkey et al. 1993). Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenham papel importante na função placentária. Ambos os processos são inversamente proporcionais ao longo da gestação (Boos et al. 2003). A sua ocorrência aumenta consideravelmente no terço final da gestação participando efetivamente da maturação placentária (Smith et al. 1997, Boos et al. 2003).

Diferentes proteínas agem regulando a ativação ou inibição da apoptose como as moléculas da família Bcl-2, sendo que a Bcl-2 é anti apoptótica e a Bax é pró-apoptótica. Essas proteínas possuem a propriedade de oligomerizar formando poros na membrana celular da mitocôndria (Antonsson et al. 1997), permitindo a saída de citocromo C para o citoplasma. Um dos principais eventos na apoptose é a ativação das caspases, as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. As caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico (Chang & Yang 2000, Grutter 2000). Atualmente são conhecidas pelo menos 12 tipos de caspases em mamíferos, classificadas em dois grupos principais: Caspases iniciadoras (Caspases -1, -

2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) e Caspases efetoras (Caspases 3, -6 e -7). Após a ativação das caspases efetoras o mecanismo de ativação da apoptose torna-se irreversível (Li & Yuan 2008).

Várias alterações bioquímicas podem ser observadas quando a célula entra em apoptose e muitas delas têm sido utilizadas para detectar esse tipo de morte celular. Entre essas, ressalta-se a clivagem do DNA genômico em fragmentos múltiplos de 180-200 pares de bases, que é um quadro típico de processo de apoptose em vários sistemas celulares (Wyllie 1980, Cohen et al. 1992). Essa fragmentação característica do genoma é facilmente visualizada laboratorialmente pela eletroforese de DNA em gel de agarose, produzindo o clássico “padrão em escada” (Wyllie et al. 1980).

O presente trabalho teve por objetivo evidenciar morfológica e bioquimicamente a apoptose em placenta de vacas em diferentes estádios de gestação através de eletroforese do DNA em gel de agarose e avaliar a imunexpressão das proteínas Bcl-2, Bax e caspase 3, através de imunistoquímica, visando a esclarecer o envolvimento das mesmas na via apoptótica ativada na maturação placentária.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 15 placentas de vacas mestiças provenientes do Frigorífico Alvorada, situado no município de Igarapé, MG. Essas amostras foram divididas em três grupos (n=5): o Grupo I foi formado por placentomas obtidos de vacas com quatro meses de gestação; o Grupo II por placentomas de vacas com seis meses de gestação e o grupo III por placentomas de vacas com nove meses de gestação. A estimativa da idade fetal foi calculada pelo comprimento craniocaudal (CRL) do feto (Noakes 1990). As amostras dos placentomas foram processadas rotineiramente para histologia e para extração de DNA. Lâminas com secções de 5µm foram coradas em HE para determinação do índice apoptótico e submetidas à reação de imunistoquímica das proteínas Bcl-2, Bax, caspase 3. Determinou-se o índice apoptótico (IA= somatório das células em apoptose/somatório das células totais x 100). A quantificação da apoptose foi realizada em campos histológicos obtidos em objetiva planacromática de 40x. Na quantificação do IA, foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentaram pelo menos três dos critérios morfológicos de inclusão (Vasconcelos & Vasconcelos 1996).

Na reação de imunistoquímica quantificou-se a marcação de Bax ou Bcl-2 (nº de células imunoreativas/ nº de células totais x 100) e a razão Bax/Bcl-2= Mediana Bax/Mediana Bcl-2. A quantificação da marcação de bax e bcl-2 foi realizada em campos histológicos obtidos em objetiva planacromática de 40x.

Para a extração do DNA os tecidos placentários foram macerados na presença de 1ml de tampão de lise (10mM Tris, 0,25% Triton x-100, 1mM EDTA)/0,125cm³ de tecido, e agitados por 10-15 segundos para ressuspender as células e completar a lise celular. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000g/4°C, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 800µl de Master Mix (790 µl de Tampão de digestão de proteína w/SDS e 10µl de Proteinase K (20 mg/ml) em cada amostra, que posteriormente foram incubadas overnight a 5 °C. Sequencialmente as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foi acrescentado 200µl de Cloreto de Lítio 7,5 M, e as amostras colocadas em gelo seco por 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm para precipitar proteínas e outras contaminações, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. As amostras de DNA foram precipitadas em etanol

100%, e lavadas uma vez em etanol 70%, secadas à temperatura ambiente e ressuspenso em H₂O. Foi então realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em 1x TBE durante 55 minutos a 120v. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob transiluminação UltraVioleta.

Para a técnica de imunistoquímica, secções desparafinadas da placenta foram submetidas à coloração pela estreptavidina-peroxidase. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-Bcl-2 clone 124 (DAKO M0887, Carpinteria, EUA), anti-Bax clone 2B2 (DAKO KAT80218, Carpinteria, EUA), e anti-caspase-3 clone JHM62, (Novocastra TM, CPP32), na diluição 1:50 (PBS 0,01M). As lâminas com 5 µm foram inicialmente hidratadas em soluções de alcoóis decrescentes e, a seguir, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão EDTA (pH 8,0), durante 20 minutos à 95°C em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com o reagente Peroxidase Blocker, cobrindo as lâminas e incubando-as por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e submetidas a banhos em tampão de lavagem (PBS 0,01, pH 7,0). Após secagem, os cortes foram incubados em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente e cobertos pelo anticorpo primário biotilado. Logo após, as secções foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com complexo estreptoavidina/HRP, em câmara úmida, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS, adicionou-se o cromógeno diaminobenzina (DAB) na diluição 1:50, que ficou incubado sobre as lâminas durante 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas com bálsamo do Canadá.

RESULTADOS

O índice apoptótico do grupo com nove meses de gestação foi maior que o do grupo com seis meses que, por sua vez foi maior que o do grupo com quatro meses de gestação. A apoptose foi reconhecida pelas características morfológicas estando presente em todas as idades gestacionais estudadas.

O gel da eletroforese do DNA genômico isolado das amostras de placenta de vacas nos diferentes estádios de gestação mostrou um “padrão de escada” compatível com a fragmentação internucleossômica do genoma característico da apoptose em todas as amostras estudadas (Fig.1).

A reação imunistoquímica para Bcl-2, Bax, caspase 3 foi positiva em todas as amostras, principalmente na junção materno-fetal, com variável intensidade da marcação. As células das vilosidades placentárias do Grupo I (4 meses), grupo II (seis meses) e Grupo III (9 meses) mostraram marcação positiva, citoplasmática e localmente extensa para Bcl-2 (Fig.2A-C). Várias células imunomarcadas apresentavam aspecto nuclear condensado e por vezes fragmentado (Fig.2C). As células das vilosidades placentárias de todos os grupos mostraram marcação positiva, citoplasmática e multifocal para Bax (Fig.3A-C). Várias células imunomarcadas apresentavam aspecto nuclear condensado e por vezes fragmentado (Fig.3C). A reação imunistoquímica para caspase 3 mostrou uma marcação positiva e difusa em todos os grupos (Fig.4A-C).

A quantificação da imunoexpressão de Bax mostrou uma diminuição de 4 para 6 meses e Bcl-2 mostrou diminuição progressiva ao longo da gestação. A quantificação da razão entre Bax e Bcl-2 foi sempre maior que 1, demonstrando um propensão a apoptose.

DISCUSSÃO

A apoptose foi facilmente reconhecida morfológicamente em todas as amostras processadas. Características peculiares do processo de apoptose tais como anoiquia, condensação da cromatina nuclear (formação de crescentes), retração citoplasmática e fragmentação nuclear e/ou citoplasmática (caracterizando a formação de corpos apoptóticos) foram observadas. A morte celular por apoptose desenvolveu-se na ausência de inflamação, que é característico da apoptose (Leist & Nicoitera 1998). Assim, observou-se o aumento do índice apoptótico com o avanço do estágio de gestação, semelhante aos resultados de estudos anteriores (Boos et al. 2003, Straszewski-Chavez et al. 2004). A apoptose ocorre na placenta em toda a gestação, mas com maior frequência no período final, em relação ao primeiro trimestre (Straszewski-Chavez et al. 2004). A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para a maturação, quanto para a liberação normal da placenta após o parto (Martins et al. 2004).

Um padrão de degradação compatível com a fragmentação internucleossômica do genoma foi observado em todas as amostras confirmando a presença da apoptose. Uma das características bioquímicas da apoptose é a clivagem internucleossômica do genoma, que pode ser reconhecida pelo clássico “padrão em escada”, por meio da eletroforese em gel de agarose, segundo Walker & Gaastra (1983) e Platel (1994). Segundo Mesner Jr. & Kaufmann (1997) e Sanders (1997) a eletroforese do DNA em gel de agarose é um método essencialmente qualitativo e o padrão em escada é produzido somente quando um considerável número de células de uma população sob estudo estiver no estágio tardio da apoptose. Se somente umas poucas células estiverem sofrendo clivagem do DNA, o padrão em escada do DNA é obscurecido, especialmente se a degradação do DNA ao acaso ocorrer juntamente com células morrendo por necrose.

A reação imunoistoquímica para Bcl-2, Bax, caspase 3 foi positiva em todas as amostras, principalmente na junção materno-fetal, com intensidade da marcação foi variável. A reação imunohistoquímica para caspase 3 mostrou uma marcação positiva intensamente e difusa. A razão de bax e bcl-2 demonstrou uma propensão a apoptose. Evidenciando a participação das mesmas na apoptose que está ocorrendo nos três estágios gestacionais, o que confirma estudos anteriores feitos com essas mesmas amostras de placentomas, onde a PCR em tempo real demonstrou que o Bcl-2 e a caspase 3 foram expressos nos três estágios gestacionais estudados, sendo a expressão de Bcl-2 menor que a de caspase 8, que é menor que a de caspase 3, apresentando o mesmo padrão, indicando que essas enzimas estão envolvidas na via apoptótica ativada na maturação placentária, exibindo um padrão de expressão ao longo da gestação (Meça et al. 2010).

CONCLUSÕES

Indica que a caspase-3, Bax e Bcl-2 estão envolvidas nos mecanismos de ativação da apoptose pela via intrínseca mitocondrial ao longo da gestação, contribuindo para o equilíbrio fisiológico da celularidade e renovação celular na placenta bovina.

Agradecimentos.- Esta pesquisa foi financiada pelo CNPq e pela FAPEMIG, a quem agradecemos pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A.M., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermoud J.J. & Mazzei G. 1997. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*.277:370–372.
- Boos A., Janssen V. & Mülling C. 2003. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction* 126:469-480.
- Chang H.Y. & Yang X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* 64:821-846.
- Cohen J.J. 1981. Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immun.* 50:55-85.
- Gerschenson L.E. & Rotello R.J. 1992. Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J.* 6:2450-2455.
- Grutter M.G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct Biol.* 10:649-655.
- Kerr J.F.R. 1999. Personal account of events leading to the definition of the apoptosis concept. *Res. Problems Cell Differ.* 23:1-10.
- Kerr J.F.R. & Searle J. 1972. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J. Pathol.* 107:41-44.
- Leist M. & Nicotera P. 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell Res.* 239:183-201
- Li J. & Yuan J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27:6194-6206.
- Martins V.M.V., Marques Jr. A.P., Vasconcelos A.C., Martins E., Santos R. L. & Lima F.C.L. 2004. Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56:157-167.
- Mcconkey D.J., Orrenius S. & Jondal M. 1993. Signal transduction in thymocyte apoptosis, p.19-30. In: Lavin M. & Waters D. (Eds), *Programmed Cell Death: The cellular and molecular biology of apoptosis*. Harwood, Chur.
- Meça K.K.O.L., Martins A.S., Del Puerto H.L. & Vasconcelos A.C. 2010. Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62:258-264.
- Mesner Jr P.W. & Kaufmann S.H. 1997. Methods utilized in the study of apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41:57-87.
- Noakes D.E. 1990. *Fertilidade e obstetrícia em bovinos*. Varela, São Paulo. 25p.
- Plantel D.E. 1994. *Gel electrophoresis: Essential data*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, p.136.
- Sanders E.J. 1997. Methods for detecting apoptotic cells in tissues. *Histol. Histopathol.* 12:1169-1177.
- Smith S.C., Baker P.N. & Symonds E.M. 1997. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* 177:57-65.

- Straszewski-Chavez S.L., Abrahams V.M., Funai E.F. & Mor G. 2004. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10:33-41.
- Vasconcelos A.C. & Vasconcelos M.M.A. 1996. Apoptose ou morte celular programada: um novo conceito em patologia? *Revta Méd. Minas Gerais.* 5:103-108.
- Walker J.M. & Gaastra W. 1983. *Techniques in Molecular Biology.* MacMillan Publishing Company, New York. 333p.
- Wyllie A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556,
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R. & Currie A.R. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-305.

Figuras

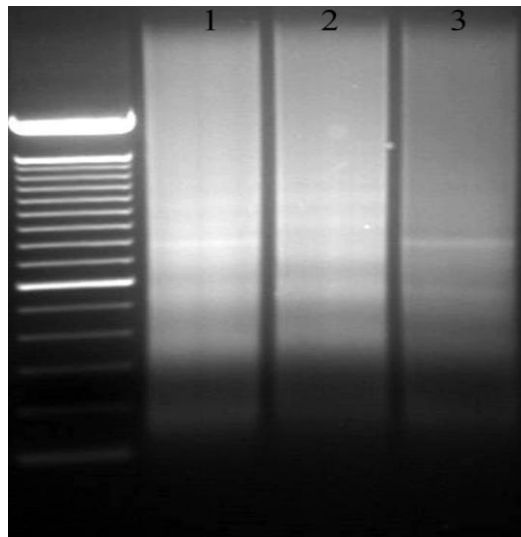


Fig.1. Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico extraído de três amostras diferentes de placenta, (1) 4 meses de gestação, (2) 6 meses de gestação, (3) 9 meses de gestação. Observar intensa fragmentação internucleossômica do genoma, evidenciado pelo clássico “padrão em escada”, indicativo de apoptose.

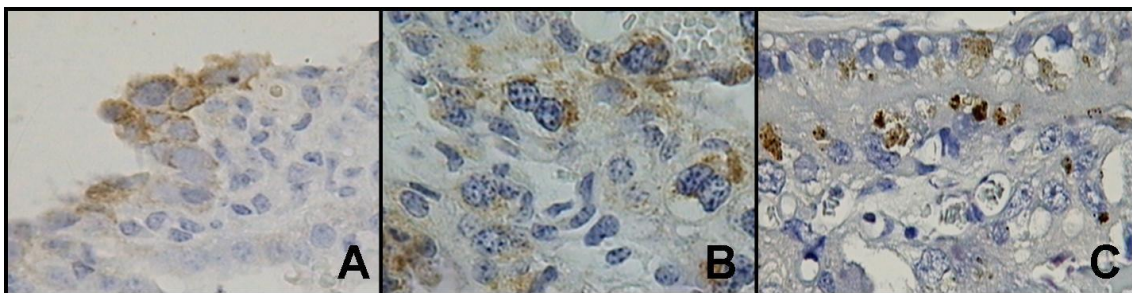


Fig.2. Placenta de vaca mostrando marcação imunohistoquímica da proteína Bcl-2. Áreas acastanhadas no citoplasma define as marcações imunoreativas. (A) Placenta com quatro meses de gestação. (B) Placenta com seis meses de gestação. (C) Placenta com nove meses de gestação. Complexo streptavidina-peroxidase, 40x.

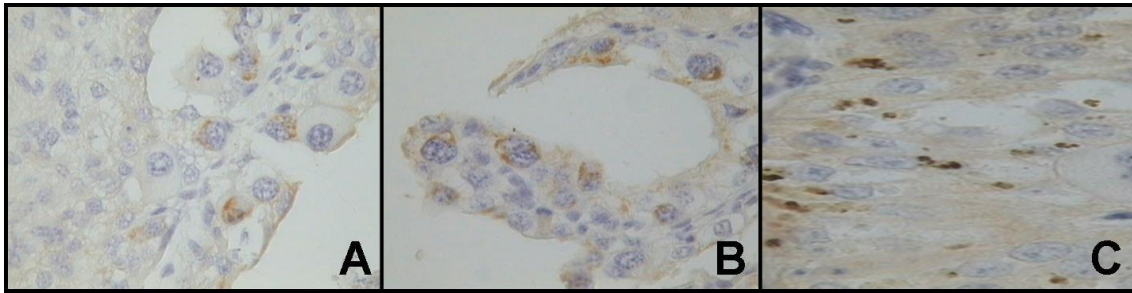


Fig.3. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica da proteína Bax. Pequenos grumos castanho escuros nos núcleos define as células imunoreativas. (A) Placenta com quatro meses de gestação. (B) Placenta com seis meses de gestação. (C) Placenta com nove meses de gestação. Complexo streptavidina-peroxidase, 40x.

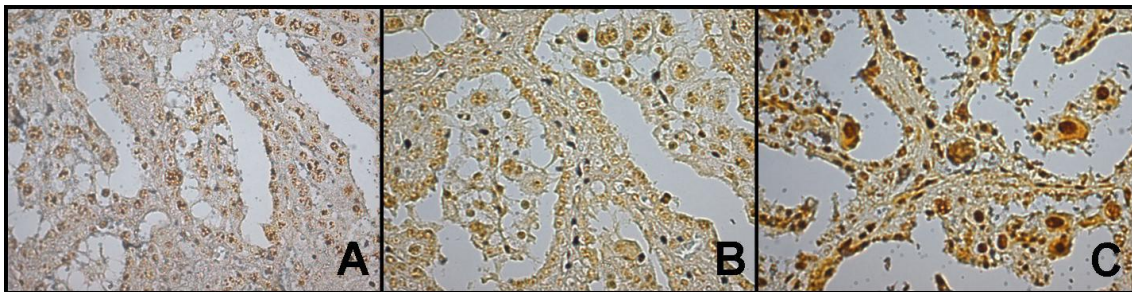


Fig.4. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica da proteína caspase 3. Grumos acastanhados no citoplasma caracteriza as áreas imunoreativas. (A) Placenta com quatro meses de gestação. (B) Placenta com seis meses de gestação. (C) Placenta com nove meses de gestação. Complexo streptavidina-peroxidase, 40x.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese se caracterizou morfológicamente a apoptose em placentomas de vacas saudáveis em diferentes estágios gestacionais. A quantificação morfométrica da apoptose, assim como sua confirmação com TUNEL, permitiu inferir a apoptose, como mecanismo de redução da celularidade placentária durante o processo de maturação e preparação para o parto. A imunohistoquímica mostrou a presença das proteínas Bcl-2, bax e caspase 3 nas três idades gestacionais estudadas, quatro, seis e nove meses, indicando que caspase-3, Bax e Bcl-2 estão envolvidas nos mecanismos de ativação da apoptose pela via intrínseca mitocondrial ao longo da gestação, contribuindo para o equilíbrio fisiológico da celularidade e renovação celular na placenta bovina.

Além disso, comprovou-se a expressão do Bcl-2 e das caspases 3 e 8, participando do processo da apoptose nas três idades gestacionais estudadas, quatro, seis e nove meses. Essas enzimas estão envolvidas na via apoptótica ativada no desenvolvimento placentário, participando da maturação e exibindo um padrão de expressão ao longo da gestação. Esses achados acrescentam novos dados ao papel da apoptose na manutenção do equilíbrio fisiológico e na maturação da placenta bovina.