

Tatiane Furtado de Carvalho

**APOPTOSE E MATURAÇÃO PLACENTÁRIA BOVINA:
UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia Investigativa
Belo Horizonte-MG
2014**

Tatiane Furtado de Carvalho

**APOPTOSE E MATURAÇÃO PLACENTÁRIA BOVINA:
UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Anilton Cesar Vasconcelos

**Belo Horizonte
2014**

Carvalho, Tatiane Furtado de.
C331a Apoptose e maturação placentária bovina [manuscrito]: um estudo imunoistoquímico e morfométrico. / Tatiane Furtado de Carvalho. -- Belo Horizonte: 2014.
72f.: il.
Orientador: Anilton César Vasconcelos.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Apoptose. 2. Placenta. 3. Imuno-Histoquímica. 4. Caspase 3. 5. Caspase 8. 6. Proteína Agonista de Morte Celular de Domínio Interatuante com BH3. 7. Proteína X Associada a bcl-2. 8. Bovinos. 9. Dissertações Acadêmicas. I. Vasconcelos, Anilton César. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.
NLM: QZ 40



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA TATIANE FURTADO DE CARVALHO

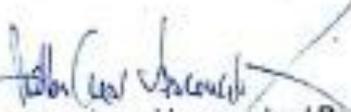
Realizou-se, no dia 13 de janeiro de 2014, às 08:00 horas, SALA 317, BLOCO C3, Departamento de Patologia Geral, ICB, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *APOPTOSE E MATURAÇÃO PLACENTÁRIA BOVINA: UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO*, apresentada por TATIANE FURTADO DE CARVALHO, número de registro 2012652381, graduada no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Anilton Cesar Vasconcelos - Orientador (UFMG), Prof(a). Humberto Eustáquio Coelho (Universidade de Uberaba), Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (UFMG), Prof(a). Paula Peixoto Campos (ufmg).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

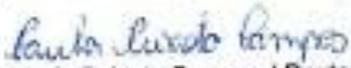
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 13 de janeiro de 2014.


Prof(a). Anilton Cesar Vasconcelos (Doutor)


Prof(a). Humberto Eustáquio Coelho (Doutor)


Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)


Prof(a). Paula Peixoto Campos (Doutora)

Dedico, não apenas esta, mas todas as conquistas da minha vida, à minha mãe Ana de Fátima, pelos incansáveis esforços em prol da minha formação humana e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar uma vida repleta de saúde e por todas as oportunidades e conquistas alcançadas!

Aos meus familiares, em especial, a minha mãe Ana de Fátima, meu irmão Rodrigo, minha sobrinha Ana Clara, e a minha avó Maria Bárbara, pela educação, incentivo, amor, paciência e saudade, que me permitiram estar aqui hoje.

Ao meu namorado, Micael, pelo amor, paciência, compreensão e apoio durante esse período em que, muitas vezes, ausentei da nossa convivência para concluir este trabalho!

Aos professores Dr. Humberto Coelho e Sr. Hélio, pelo apoio, amizade e por serem exemplos para mim de pessoas vencedoras. Meu muito obrigada por terem me recebido de braços abertos e com tanto amor!!! Esforço-me a cada dia para seguir os seus exemplos de dedicação ao trabalho e generosidade com as pessoas, sempre!

Ao meu orientador prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos, pelo acolhimento e confiança. Agradeço pela liberdade concedida, pela paciência e por dividir comigo as expectativas deste trabalho. Admiro pelo caráter e respeito aos alunos.

À professora e colega de laboratório Ms. Núbia Pereira, minha eterna gratidão pelos ensinamentos, paciência e orientações durante este trabalho.

Às Professoras Dras. Milene Alvarenga Rachid e Tatiane Alves da Paixão (Depto de Patologia Geral, ICB-UFMG), pela atenção e cooperação em momentos importantes dessa trajetória. À todos os professores do Departamento de Patologia Geral, pela colaboração. Em especial ao Laboratório de Patologia Comparada e a equipe do Prof. Giovanni Dantas Cassali, pela ajuda e colaboração durante os processos de imunoistoquímica.

Aos amigos e colegas de mestrado, Bruno, Diego e Vitor, pelas conversas, apoio, risadas e amizade.

Às amigas e colegas de laboratório, Teresa, Heloísa, Camila Justiniana, Camila Couto, Bárbara, e Jéssica, pelo apoio e colaboração na rotina diária. A nossa querida técnica de laboratório Olinda, pela grande disponibilidade que demonstrou, nos atendendo sempre com muita rapidez.

Aos amigos e amigas que mesmo distante se fazem presentes em minha vida, Cláudio Henrique, Karen, Thays, Méruli e Giovanna, amigos preciosos e verdadeiros.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o progresso desta pesquisa. Mesmo nas atitudes mais simples.

Muitíssimo obrigada!

*“Não desanimes. Persiste mais um tanto.
...Esquece as sugestões do medo destrutivo.
...Avança ainda que seja por entre lágrimas.
...Não te impressiones nas dificuldades.
...Não creias em realizações sem esforço.
...Se te enganaste em algum trecho do caminho,
reajusta a própria visão e procura o rumo certo.
...Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor
que possas realizar... E assim vencerás”.*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A liberação da placenta após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação completa do placentoma, que está relacionada com a diminuição da celularidade dos tecidos fetal e materno. A apoptose é requerida tanto para a maturação quanto para a liberação normal da placenta após o parto. 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, imunoistoquímica e histoquímica. As lâminas obtidas foram coradas em HE, Picrosirius Red e submetidas à análise imunoistoquímica das proteínas Caspase 3, Caspase 8, Bax, Bid e Bcl-2. O aumento no número de vasos não necessariamente se associou ao aumento do calibre destes durante a evolução da gestação. Os resultados de histomorfometria revelaram aumento da marcação para Bax e Caspases 3 e 8 em células trofoblásticas binucleadas no final da gestação, enquanto o Bid se manteve sem alteração significativa. A histomorfometria das células trofoblásticas mononucleadas revelou expressão alta para Bax no início de gestação, com diminuição aos 6 meses de gestação e aumento das imunomarcações para Caspases 3 e 8, e Bid com o avanço gestacional. Os colágenos tipo I e III não aumentaram do terço médio ao final da gestação, o que é importante para a diminuição da adesão materno-fetal. A dissociação das fibras do estroma das vilosidades coriônicas diminuiu aos 9 meses de gestação, ao contrário do índice apoptótico que aumentou progressivamente com o avanço da gestação. Esses resultados confirmam que as Caspases 3 e 8, e o Bax estão envolvidos nos mecanismos de ativação da apoptose pela via intrínseca mitocondrial e/ou extrínseca ao longo da gestação em células trofoblásticas binucleadas, e que nas células trofoblásticas mononucleadas o Bax deixa de ser importante, enquanto o Bid e as Caspases 3 e 8 se tornam os mais significativos.

Palavras-chave: Maturação placentária, apoptose, imunoistoquímica, Caspase 3, Caspase 8, Bid, Bax, bovinos.

ABSTRACT

Placental release after birth involves loss of maternal-fetal adhesion and occurs only after complete maturation of the placentome, which is related to the decrease in cellularity of fetal and maternal tissues. Apoptosis is required for both the normal maturation and release of the placenta after birth. The aim of this study was to evaluate the occurrence of apoptosis in samples of placenta of cows in different stages of gestation. Samples of 15 healthy cows placentomes 4 (n = 5), 6 (n = 5) and 9 (n = 5) months of gestation were harvested and processed for routine histology, immunohistochemistry and histochemistry. The slides were stained with HE, Picrosirius Red and subjected to immunohistochemical analysis of proteins Caspase 3, Caspase 8, Bax, Bid and Bcl-2. Increase in number of vessels was not associated to increase in vascular area, during progression of gestation. The results of histomorphometry revealed increased labeling for Bax and Caspases 3 and 8 in trophoblastic binucleated cells in late pregnancy, awhile Bid remained without significant change. Histomorphometry analyzing the mononuclear trophoblast cells showed a high expression for Bax in early pregnancy, but decreased at 6 months of gestation. Immunolabeling revealed increased Caspases 3/8 and Bid with advancing of gestation. Further evaluation of type I and III collagens showed a decrease of both types of collagens at the end of gestation, which is very important to decrease maternal-fetal adhesion. The dissociation of the fibers of the stroma of chorionic villi decreased at 9 months of gestation, unlike the apoptotic index, which increased progressively with advancing gestation. These results confirm that Caspases 3 and 8 and Bax are involved in the mechanisms of activation of apoptosis through mitochondrial intrinsic and or extrinsic pathway during pregnancy in trophoblastic binucleated cells. In mononuclear trophoblast cells Bax loses importance in the apoptosis process, awhile Bid and caspases 3 and 8 become the most significant.

Keywords: Placental maturation, apoptosis, immunohistochemistry, Caspase 3, Caspase 8, Bid, Bax, cattle.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Timo de camundongos. A: Controle positivo de anti-Bax, na diluição de 1:50. B: Controle positivo de anti-Bid na diluição de 1:100. Complexo estreptavidina-peroxidase, 20x.....	34
Figura 2	A: Timo de camundongo, controle positivo anti-Bcl-2, na diluição de 1:50. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x. B: Controle negativo para a reação com o anticorpo Bcl-2 em placenta de vaca, 40x.....	34
Figura 3	Controles negativos em placentas de vacas. A: Anti-Bax. B: Anti-Bid. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.....	34
Figura 4	A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do Índice apoptótico em HE. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcaçã para o anticorpo anti-Bid.....	37
Figura 5	A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcaçã para o anticorpo anti-Bcl-2. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcaçã para o anticorpo anti-caspase 8.....	37
Figura 6	A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcaçã para o anticorpo anti-caspase 3. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcaçã para o anticorpo anti-Bax.....	38

CAPÍTULO 2

- Figura 1 (A) Análise morfométrica do número de vasos em placenta de vaca com 4, 6 e 9 meses de gestação. O número de vasos aumentou de 4 ($4,03 \pm 0,56$) para 6 meses ($5,15 \pm 0,33$), mas não de 6 para 9 meses de gestação ($5,53 \pm 0,43$) com $p < 0,05$. (B) Análise morfométrica da área média dos vasos em placentas bovinas com 4, 6 e 9 meses de gestação. A área de vasos foi maior no grupo com 4 meses de gestação ($3,88x \pm 0,25x$), diminuindo aos 6 ($3,08 \pm 0,22$) e mantendo-se similar aos 9 meses de gestação ($2,71 \pm 0,18$), com $p < 0,001$ 61
- Figura 2 Fotomicrografias de placenta de vaca. (A) representa o grupo com 4 meses de gestação, com menor concentração de colágeno tipo I e III. (B) representa o grupo com 6 meses de gestação, com maior concentração de colágeno tipo I, caracterizado por birrefringência e coloração vermelha, e maior concentração de colágeno tipo III, caracterizado pela reduzida birrefringência e coloração verde. (C) representa o grupo com 9 meses de gestação, com redução do colágeno tipo I e III. Picrosirius Red, microscopia óptica sob luz polarizada, aumento de 10x..... 59
- Figura 3 Médias e erros padrões das áreas de colágenos tipo I e III nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação, obtidos com a coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada. (A) A quantidade de colágeno I aumentou de 4 ($0,31 \pm 0,17$) aos 6 ($1,78 \pm 0,47$), mas não de 6 para 9 ($1,33 \pm 0,43$) meses de gestação ($p < 0,05$). (B) A área de colágeno III aumentou de 4 ($0,26 \pm 0,48$) para 6 ($0,92 \pm 0,12$) meses de gestação, mas não de 6 para 9 ($0,63 \pm 0,97$) ($p < 0,05$)..... 61
- Figura 4 Placenta bovina mostrando marcação imunoistoquímica para Bax. Áreas acastanhadas no citoplasma definem as marcações imunoreativas. (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x. (*) região materna; (VF) vilo fetal; (setas pretas) células binucleadas; (setas vermelhas) células mononucleadas..... 60

- Figura 5 (A) Distribuição do índice de marcação para Bax nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcagem diminuiu do grupo com 4 ($21,64 \pm 0,64$) para 6 ($19,08 \pm 0,53$), mas não de 6 para 9 meses de gestação ($18,25 \pm 0,49$), com $p < 0,0002$. (B) Distribuição do índice de marcação para Bax nas células trofoblásticas binucleadas imunomarcadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($0,35 \pm 0,046$) para o de 6 ($1,39 \pm 0,12$) e 9 meses de gestação ($2,68 \pm 0,16$), com $p < 0,0001$ 62
- Figura 6 Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Bid em células trofoblásticas mononucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta vermelha: célula mononucleada e epitélio materno). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x..... 60
- Figura 7 (A) Distribuição do índice de marcação para Bid nas células trofoblásticas mononucleadas imunomarcadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcagem aumentou do grupo com 4 meses ($51,46 \pm 1,166$) para o com 9 meses de gestação ($60,75 \pm 1,058$), mas não para o com 6 meses de gestação ($49,52 \pm 1,33$), com $p < 0,0001$. (B) Distribuição do índice de marcação para Bid nas células trofoblásticas binucleadas imunomarcadas nos grupos com 4 ($3,23 \pm 0,23$), 6 ($2,87 \pm 0,18$) e 9 ($3,02 \pm 0,20$) meses de gestação. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos..... 62
- Figura 8 Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Bid em células trofoblásticas binucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta preta: célula binucleada). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x..... 60
- Figura 9 Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Caspase 3. Áreas acastanhadas no citoplasma definem marcações imunorreativas (seta vermelha - células mononucleadas; setas pretas: células binucleadas). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x..... 60

- Figura 10 (A) Distribuição do índice de marcação para Caspase 3 nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcacão aumentou progressivamente do 4º mês ($12,27 \pm 0,57$) para o 6º mês ($14,98 \pm 0,49$) e para o 9º mês de gestação ($26,43 \pm 1,10$) com $p < 0,0001$. (B) Distribuição do índice de marcação para Caspase 3 nas células trofoblásticas binucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($0,17 \pm 0,027$) para o de 6 ($0,44 \pm 0,04$) e para 9 meses de gestação ($0,94 \pm 0,07$), com $p < 0,0001$ 62
- Figura 11 Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Caspase 8. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta preta: célula binucleada e seta vermelha: células mononucleadas e epitélio materno;). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x..... 61
- Figura 12 (A) Distribuição do índice de marcação para Caspase 8 nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($12,16 \pm 1,13$) para o de 6 ($18,41 \pm 1,41$) e para 9 meses de gestação ($23,19 \pm 1,56$), com $p < 0,0001$. (B) Distribuição do índice de marcação para Caspase 8 nas células trofoblásticas binucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses de gestação ($0,83 \pm 0,15$) aos 9 meses de gestação ($1,82 \pm 0,26$), mas não houve diferença entre o grupo com 6 meses de gestação ($1,05 \pm 0,21$) e os demais ($p < 0,01$)..... 63

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Fotomicrografias de placenta de vaca. (A) representa o grupo com 4 meses de gestação, com menor índice apoptótico. (B) representa o grupo com 6 meses de gestação. (C) representa o grupo com 9 meses de gestação e com maior índice apoptótico. Apoptose caracterizada morfológicamente por retração celular,

anóiquia, condensação citoplasmática e nuclear, além de fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (setas). Hematoxilina-Eosina, Barra = 50 µm..... 65

Figura 2 Distribuição do índice apoptótico em placenta bovina nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. O índice apoptótico aumentou do grupo com 4 meses (14,93±0,54) para o de 6 (20,83±1,51) e 9 meses de gestação (36,80 ±1,21), com $p<0,0001$ 65

Figura 3 Análise morfométrica da dissociação das fibras do estroma de vilosidades coriônicas em placentas bovinas com 4, 6 e 9 meses de gestação. O edema de vilosidades coriônicas foi similar aos 4 (626,30± 34,09) e 6 meses (664,40± 25,74), e diminuiu aos 9 meses de gestação (561,70± 26,13), com $p<0,001$ 66

Figura 4 Placenta de vaca mostrando marcação imunohistoquímica para Bcl-2 em células trofoblásticas mononucleadas e binucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta vermelha: célula mononucleada e epitélio materno; seta preta: células binucleadas). (A e B) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase. (A) 40x. (B) 20x..... 67

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
Placenta dos bovinos.....	17
Células gigantes trofoblásticas bovinas.....	18
Maturação e expulsão placentária.....	20
Apoptose.....	21
Apoptose no desenvolvimento placentário.....	24
Avaliação de colágeno.....	26
OBJETIVOS	28
Objetivo geral.....	28
Objetivos específicos.....	28
MATERIAL E MÉTODOS	30
Amostras.....	30
Processamento histopatológico	30
Coloração de Picrosirius red	31
Imunoistoquímica.....	31
Morfometria.....	35
Parâmetros e análise morfométrica.....	35
Determinação do número mínimo representativo de campos histológicos e imunoistoquímicos.....	36
Delineamento experimental e análise dos resultados.....	38
REFERENCIAS	39

CAPÍTULO 2

ABSTRACT	47
RESUMO	48
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS	51
Achados de número e área de vasos.....	51
Avaliação histoquímica de colágeno.....	51
Avaliação imunoistoquímica.....	51
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	54
REFÊRENCIAS	55
Legenda das figuras.....	57

CAPÍTULO 3

OUTRAS ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	64
Avaliação microscópica.....	64
Índice apoptótico.....	64
Dissociação das fibras do estroma.....	65
Reação de imunoistoquímica para bcl-2.....	66
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão intermediário entre a mãe e o feto servindo para suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios e regulação do ambiente uterino (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Nos bovinos é caracterizada como cotiledonária, devido à presença de cotilédones fetais, que se conectam às carúnculas endometriais. Os vilos coriônicos formam os cotilédones, unidade fetal que, junto com as carúnculas, formam as unidades funcionais da placenta de ruminantes, o placentoma. Estes variam em número nas diferentes espécies de ruminantes, sendo de 70 a 142 na vaca (PINTO, 2002). E microscopicamente observa-se na placenta bovina que o epitélio trofoblástico é constituído por dois tipos celulares distintos: as células trofoblásticas mononucleadas e as células trofoblásticas gigantes (WOODING, 1984).

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 (NUNES et al., 2001). 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).

Nos momentos que antecedem o parto a placenta precisa já estar hipocelularizada para que seja liberada normalmente (BARRETO FILHO; MARQUES JÚNIOR, 1993). Vacas com retenção placentária (RP) apresentam maior número de células epiteliais maternas (SANTOS; MARQUES JÚNIOR, 1998). Estudos morfológicos demonstraram que a maturação placentária está relacionada com a diminuição da população celular dos tecidos fetal e materno no placentoma (BARRETO FILHO; MARQUES JÚNIOR, 1993; MARQUES

JÚNIOR, 1988; SANTOS, 1995; SANTOS; MARQUES JÚNIOR; BARRETO FILHO, 1997) e com a ocorrência de apoptose (MARTINS, 1999; NUNES et al., 2001).

Durante a maturação normal antes do parto, o número de células binucleadas diminui drasticamente, o que não ocorre em caso de retenção (GROSS et al., 1991). As causas de retenção de placenta relacionadas com as falhas nos mecanismos de maturação dos placentomas são identificadas como as mais importantes, por serem responsáveis por 2/3 dos casos de retenção placentária em bovinos (GRUNERT et al., 2005).

Outro mecanismo importante na maturação dos placentomas é a metabolização do colágeno tipo III por enzimas collagenases. As vacas com retenção de placenta são incapazes de metabolizar o colágeno do tipo III (SHARPE et al., 1990).

Em bovinos a RP é normalmente causada por distúrbios no mecanismo de descolamento dos placentomas: placentomas imaturos, edema de vilosidades, necrose epitelial do córion e da cripta, e hiperemia dos placentomas (GRUNERT; BIRGEL, 1989).

A retenção das membranas fetais é um grande problema na ginecologia bovina, causando problemas reprodutivos e aumentando o custo de produção. A morfologia dos placentomas provenientes de retenção de membranas fetais pode estar associada à maturação insuficiente, ou seja, redução insuficiente no número de células do epitélio das criptas maternas durante o período do pré-parto (BOOS et al., 2003). Falhas na expulsão da placenta são comuns, com taxas que vão de 3% a 12%, e aumentam em casos de aborto, parto prematuro, parto gemelar e parto induzido (SCHLAFER et al., 2000).

Nesta dissertação procurou-se avaliar morfometricamente vários parâmetros como o número e área de vasos nos componentes materno e fetal da placenta, e a proporção de colágeno tipo I e III em diferentes idades gestacionais. Avaliou-se também a imunoexpressão das Caspases 3 e 8, do Bax e do Bid em células trofoblásticas binucleadas e demais células do placentoma, correlacionando estes dados com a idade gestacional.

REVISÃO DE LITERATURA

Placenta dos bovinos

A placentação proporciona os processos de intercâmbio fisiológico, tais como respiração e nutrição entre o conceito e o epitélio uterino materno. A partir disso, surge a placenta, sendo um órgão transitório, responsável pelo suporte metabólico, proteção mecânica e imunológica do feto (MORAIS-PINTO, 2002).

Durante o desenvolvimento do blastocisto, o embrião desenvolve uma cavidade central preenchida por líquido denominada blastocele, circundada por uma camada de células conhecidas como trofoectoderma (KING et al., 1980). Essas células contribuem exclusivamente para a formação da placenta e das estruturas extra-embrionárias de vital importância para a sobrevivência de embriões de mamíferos (CROSS et al., 1994).

Durante a pré-implantação, a comunicação materno-embrionária é mediada pelo trofoblasto. A janela de implantação representa o período de máxima receptividade uterina para implantação (DUC-GOIRAN et al., 1999). O termo implantação é utilizado habitualmente para indicar a união do trofoblasto com a parede uterina, mas este grau de união varia notadamente entre as espécies. As superfícies de contato entre os tecidos materno e fetal aumentam a partir do desenvolvimento das vilosidades na superfície do córion. Estas vilosidades apresentam tecido conjuntivo e vasos no seu interior. Nos ruminantes, a sua relação com o endométrio é do tipo vilosa. Em bovinos, a implantação se inicia entre 28 e 32 dias de gestação e finaliza-se entre 40 e 45 dias após a ovulação (NODEN; DE LAHUNTA, 1985).

A placenta na maioria dos mamíferos é caracterizada pela presença de áreas de contato entre as partes materna e fetal, o que acontece a partir de interdigitações (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placenta bovina pode ser classificada como cotiledonária, caracterizada pela presença de regiões específicas de trocas, os chamados placentomas, compostos pela

carúncula materna e pelo cotilédone fetal, e responsáveis por trocas respiratórias e de nutrientes. Entre essas estruturas denominadas placentomas, pode-se também observar áreas intercotiledonárias de córion liso. O crescimento e desenvolvimento normal dos placentomas são essenciais para o desenvolvimento e crescimento fetais (LAVEN; PETERS, 2001).

Além de cotiledonária, a placentação bovina é do tipo sinepteliocorial devido à fusão de células trofoblásticas com células do epitélio uterino (DENKER, 1993). A placenta sinepiteliocorial é classificada de acordo com suas características histológicas, ou seja, o número de camadas celulares que separa a circulação materna da fetal. São elas: endométrio materno, tecido conjuntivo, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo fetal e endotélio fetal (WOODING, 1992; SCHLAFER et al., 2000). O fluxo sanguíneo materno-fetal da placenta bovina é, inicialmente, multiviloso e tende a tornar-se contracorrente, o que o diferencia da placenta humana, onde as células trofoblásticas ficam diretamente em contato com o sangue materno (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Assim a placenta de ruminantes tem uma estrutura anatômica uniforme baseada nas áreas de aposição da membrana feto-maternal e sua proliferação para formar placentomas (WOODING et al., 1997). Entre 70 a 120 placentomas são formados durante a gestação no bovino, os quais aumentam diversas vezes seu tamanho original, sendo maiores aqueles localizados no terço médio do corno gestante, com a estabilização do crescimento ocorrendo entre os dias 180 e 210 da gestação (MARQUES JÚNIOR et al., 1993).

Células gigantes trofoblásticas bovinas

A placenta bovina é revestida por epitélio trofoblástico constituído por células trofoblásticas mononucleadas e as células trofoblásticas gigantes, podendo estas ser binucleadas ou possuírem apenas um núcleo gigante (IGWEBUIKE, 2005; WOODING, 1992).

As células trofoblásticas mononucleadas formam a maioria da interface materno-fetal e estão primariamente envolvidas com a troca de nutrientes (SCHLAFER et al., 2000). As células

trofoblásticas gigantes compreendem cerca de 20% da população de células trofoblásticas da placenta (SCHLAFER et al., 2000; BERTOLINI et al., 2006) e migram rotineiramente do epitélio trofoblástico e se fundem com células do epitélio uterino, formando células trinucleadas (WOODING, 1992; WANGO et al., 1990). Este mecanismo é importante para que ocorra o transporte e liberação dos seus grânulos no compartimento materno. Estes grânulos contêm hormônios, como o lactogênio placentário (ANTONY et al., 1995), estradiol (METAMOROS et al., 1994) e progesterona (WANGO et al., 1990), além de fatores de crescimento, associados ao desenvolvimento fetal e manutenção da gestação (SCHLAFER et al., 2000).

Essa migração que ocorre nas células trofoblásticas binucleadas é a característica mais importante na placenta de ruminantes, e ocorre através de *gap junction* (WOODING, 1992), iniciando a migração entre os dias 18 a 20 da gestação e permanece por todo o período gestacional (LEISER; KAUFMANN, 1994). Esta capacidade das células binucleadas de migrar e fusionar-se às células epiteliais uterinas maternas têm por resultado a formação de placas sinciciais dando ascensão à classificação da placenta de ruminantes como sinepteliocorial (WOODING, 1992). Durante toda a gestação ocorre a formação e a migração das células trofoblásticas gigantes, entretanto quanto mais próximo o final da gestação, menor é o seu número e o período de vida (WOODING, 1992; GREEN et al., 2000; BERTOLINI et al., 2006).

Acredita-se que as células trofoblásticas binucleadas sejam originárias de células trofoblásticas mononucleadas através de um processo de mitose acitocinética, ou seja, por uma sequência de mitoses com duplicação cromossômica e cariocinese (divisão nuclear), porém, sem citocinese correspondente (divisão citoplasmática), ou seja, os cromossomos e os núcleos estão duplicados, mas o citoplasma não se divide (KLISH et al., 1999). Durante os primeiros estágios de seu desenvolvimento, as células binucleadas são aleatoriamente posicionadas de forma mais profunda no trofoectoderma em uma posição intraepitelial, portanto, estas células não fazem contato com a membrana basal ou com o ápice microvilar do trofoectoderma (WOODING, 1984; WANGO et al., 1990).

As células binucleadas sofrem alterações em todas as fases da gestação, mas em torno do 150º dia esse processo se intensifica. A cromatina começa a se condensar tornando o núcleo cada vez mais condensado. O citoplasma reduz o seu volume e perde o seu aspecto granular. A membrana plasmática também tem seu contorno alterado (MORAIS- PINTO, 2002).

Maturação e expulsão placentária

A liberação da placenta após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação completa do placentoma, que está relacionada com a diminuição da população celular dos tecidos fetal e materno (MALARD et al., 1996). A apoptose parece ser requerida tanto para a maturação quanto para a liberação normal da placenta após o parto (NUNES et al., 2001, MARTINS et al., 2004). No momento do parto, a apoptose nas células do placentoma é mais intensa e pode estar associada a mudanças hormonais (MARTINS et al., 2004).

Diversos fatores ou componentes do placentoma têm sido descritos como importantes no mecanismo de retenção de placenta em bovinos. O declínio no número de células trofoblásticas binucleadas está relacionado com a correta separação placentária após o parto normal de bovinos. A persistência destas células leva a retenção placentária. Além disso, o número de células apoptóticas em placentomas de vacas com parto sem RP é maior do que em vacas com RP (GROSS et al. 1991).

Macrófagos, presentes no parênquima das carúnculas bovinas, são importantes para modelar os componentes do estroma materno e manter o tamanho e formato de cada placentoma. Esse processo ocorre durante toda a gestação, diminuindo a fixação do tecido fetal no materno ao final para liberação das membranas fetais após o parto (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

A redução no suprimento sanguíneo 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 as enzimas proteolíticas, tais como a colagenase, diminuindo a adesão da matriz extracelular na interface materno-fetal (JEFREY et al., 1991). A liberação fisiológica da placenta ocorre geralmente entre três a seis horas após o parto. A proteólise do cotilédone e a diminuição da adesividade na interface carúncula-cotilédone resultam na liberação da placenta. As 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 diminui em vacas com retenção placentária (GROSS et al., 1985).

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

Apoptose

A apoptose ou morte celular fisiológica ou programada é caracterizada como um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA internucleossômico e, talvez o mais importante, as alterações na superfície celular que possibilitam o rápido reconhecimento e englobamento das células apoptóticas pelas células fagocitárias vizinhas, evitando-se a indução de reação inflamatória (KUAN; KUIDA, 2003).

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

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

A apoptose ocorre, principalmente, por duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é iniciada pela interação de receptores de membrana (conhecidos como receptores de morte) com seus ligantes específicos (HENGARTNER, 2000). Esses receptores são aqueles que fazem parte da família do fator de necrose tumoral, como TNFR e Fas (Apo1/CD59), presentes na membrana celular (REED, 2000). Quando há ligação do receptor ao seu ligante, há formação de um complexo sinalizador de indução de morte (DISC). O DISC incorpora moléculas adaptadoras como FADD (domínio de morte associado ao Fas) que se ligam à pró-caspase iniciadora 8, através de domínios de morte (OPFERMAN; KORSMEYER, 2003; ELMORE, 2007). O complexo formado por estas caspases, o receptor de morte e as moléculas adaptadoras é chamado de “apoptossomo iniciador”. Na sequência, caspases executoras são ativadas pelas iniciadoras ou estas últimas irão gerar sinais que irão acoplar-se à via extrínseca atingindo bioquimicamente o conjunto de mitocôndrias. Ao nível da mitocôndria a liberação de citocromo c é controlada principalmente pelas proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax) (AMARANTES-MENDES, 2003).

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por estímulos que resultam na permeabilização da membrana externa da mitocôndria promovendo a liberação de proteínas do espaço intermembranoso desta organela. Diversas dessas proteínas iniciam ou regulam a ativação das caspases, a principal delas é o citocromo c (GREEN, 2003; OW et al., 2008). No citoplasma, o citocromo c se liga ao fator ativador de protease apoptótica - 1 (Apaf-1). O Apaf-1 é um monômero que quando ligado ao citocromo c, na presença de ATP, sofre mudanças conformacionais, formando um heptâmero. Há então a exposição de domínios de recrutamento de caspase ativada (CARD), permitindo a ligação da pró-caspase 9, formando o apoptossomo. Este consiste de uma plataforma que promove a ativação da caspase 9 que, posteriormente, ativa as caspases executoras (REED, 2000; OW et al., 2008).

Sinais de estresse intracelular podem desencadear a apoptose, em decorrência de disfunção mitocondrial, lesão do DNA ou distúrbios nas vias metabólicas, como aumento do cálcio intracelular, redução do pH e estresse oxidativo. Diante dessas alterações celulares, pode

haver a translocação de proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, *Bax* e *Bid*, do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas são membros da família *Bcl-2* e exercem função reguladora da apoptose. Proteínas como *Bcl-2* e *Bcl-XL*, são anti-apoptóticas, enquanto a *Bax*, *Bad* e *Bid* são pró-apoptóticas. A translocação dessas proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria gera liberação do citocromo-c, presente entre a membrana mitocondrial externa e interna, para o citosol. Neste, o citocromo-c forma um complexo que leva à ativação da caspase-9, que, por sua vez, ativa caspases efetoras (executoras) (PATEL; GORES, 1998).

Alguns estímulos externos como radiação ultravioleta e maior expressão da proteína supressora de tumor p53, podem ativar as proteínas pró-apoptóticas, levando ao aumento na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (JAMES; GREEN, 2004; KIM et al., 2006). Além disso, a proteína Bid também pode ser ativada pela caspase 8, promovendo a interação entre as duas vias apoptóticas (TAYLOR et al., 2008).

Proteínas pró-apoptóticas como Bax, que tem como alvo as membranas mitocôndrias, podem induzir dano e apoptose, mesmo quando as caspases são inativadas (XIANG et al., 1996).

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

A maioria das alterações morfológicas observadas por Kerr et al. (1972) é causada por uma série de cisteíno proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose (COHEN, 1997; MINKO et al., 2001). Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. A especificidade pelos seus respectivos substratos é determinada por quatro resíduos amino-terminal no sítio de clivagem (STENNICKE; SALVESEN, 1998; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000). A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desmontagem da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, condensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são

comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000).

As células apoptóticas são evidenciadas através da utilização de marcadores celulares, alguns deles voltados para a detecção de fragmentação do DNA genômico, facilmente interpretáveis em cortes de tecido previamente incluídos em parafina (GOWN; WILLINGHAM, 2002). Anticorpos mono e policlonais utilizados em métodos imunoistoquímicos têm alta especificidade no alcance de células em apoptose ou em proliferação (STICHOCOMBE et al., 1995; WOOD et al., 1999).

O diagnóstico de morte celular é possível de ser feito baseado em fatores morfológicos, como fragmentação nuclear, e também funcionais, mediante o aumento da permeabilidade de membrana. Apesar da dificuldade existente em detectar-se células que estão morrendo ou que acabaram de morrer, aquelas que sofrem apoptose podem ser identificadas em cortes de tecido, através da identificação de mudanças nucleares distintas e da utilização de métodos imunoistoquímicos, relacionados à patologia molecular (MAJNO; JORIS, 1996).

Apoptose no desenvolvimento placentário

O processo de maturação da placenta bovina é caracterizado por alterações histológicas no epitélio das criptas maternas, promovendo regressão das células epiteliais maternas, afinamento e desnudamento das criptas uterinas, além de diminuir a distância entre o sangue materno e fetal, mecanismo que a placenta encontra para atender a crescente demanda do feto nos últimos meses de gestação. A apoptose reflete o início desta regeneração tecidual e a contínua nutrição histiotrófica do feto, a qual consiste na fagocitose de células epiteliais maternas apoptóticas. Estas características são consideradas parte do processo de maturação placentária, o qual também é um pré-requisito para a desconexão materno-fetal e liberação das membranas fetais após o parto. Desta forma, a apoptose em células das criptas do

epitélio materno e em menor proporção em epitélio do trofoblasto é detectada durante toda a gestação no placentoma, refletindo a renovação normal e a necessidade da apoptose para a homeostasia placentária (BOSS et al., 2003).

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 (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2004). Nesse caso, a apoptose parece estar relacionada com o mecanismo de remodelação placentária auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais (SMITH et al., 1997).

A apoptose é crucial para o desenvolvimento e homeostase da placenta (CROCKER et al., 2003). O processo apoptótico ocorre nas células trofoblásticas e tem como objetivo a renovação dessas células (RANGO, 2008). Esse processo é regulado ao longo do desenvolvimento placentário, sendo que, no terceiro trimestre gestacional a incidência de apoptose é maior do que no primeiro (LEVY; NELSON, 2000).

Além disso, a apoptose nas células trofoblásticas está associada à proteção imunológica. O Fas ligante (FasL) induz apoptose em células T que expressam receptor em suas membranas conhecido como Fas ou CD95 (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). O sistema Fas-FasL, que atua na regulação das funções imunes através da morte celular mediada por linfócitos T, é expresso também nos tecidos reprodutivos (BALDWIN et al., 1999; GUTIERREZ et al., 1999). Células trofoblásticas expressam funcionalmente FasL, o que provavelmente contribui com mecanismos de evasão de ações do sistema imune pela regulação negativa do receptor Fas, matando linfócitos pela ligação com FasL (RAJASHEKHAR et al., 2003). A interação Fas-FasL contribui para que a placenta seja uma região imunologicamente privilegiada (LEVY; NELSON, 2000).

A apoptose em células trofoblásticas pode ser iniciada pela ligação da citocina TNF- α aos seus receptores (TNF-R1 e TNF-R2), presentes nas células trofoblásticas (LEVY; NELSON, 2000). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos ativados por IFN- γ ,

induzem apoptose em células trofoblásticas. Essa indução está associada à secreção de TNF- α e de Indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO), que cataboliza a degradação de triptofano das células trofoblásticas, reação indutora de apoptose (HUPPERTZ et al., 2006). Estudos demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , aumentam a expressão de Fas/FasL nas células trofoblásticas, enquanto, citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-6) diminuem a expressão de Fas/FasL e ativam proteínas que inibem a apoptose (ASCHKENAZI et al., 2002). As células trofoblásticas também apresentam inibidores de apoptose, como proteínas da família Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (HUPPERTZ et al., 2006).

O controle dos processos apoptóticos nas células trofoblásticas é extremamente importante e garante o sucesso da gestação. Além disso, o controle da apoptose durante o desenvolvimento embrionário normal é importante como forma de deleção de diversas proteínas associadas à letalidade e mal desenvolvimento fetal (HAEZELL; CROCKER, 2008). Tanto o excesso quanto a deficiência da apoptose na placenta estão associados aos abortos e com complicações durante a gestação (CROCKER et al., 2003; HUPPERTZ et al., 2006).

Avaliação de colágeno

A coloração histoquímica Picosírius-red contribui para o estudo de estruturas colágenas. Pelo fato das moléculas de colágenos serem ricas em aminoácidos básicos, estes reagem fortemente com colorações ácidas como o Picosírius. Esta coloração apresenta uma molécula altamente ácida que possui seis grupos sulfônicos. Os grupos cromógenos desta molécula apresentam alta seletividade para o colágeno, sendo capazes de detectar pequenas quantidades do mesmo (MONTES, 1996).

Esta coloração realça a birrefringência já existente no colágeno, devido ao paralelismo e organização tecidual. As moléculas do Picosírius Red agregam às moléculas de colágeno formando estruturas visíveis sob luz polarizada (MONTES, 1996; ORTEGA et al., 2003).

Os vários tipos de colágeno apresentam diferentes padrões de agregação com as moléculas do Picrosírius, desta forma as fibras apresentam diferentes colorações, sendo possível identificá-las. O colágeno Tipo I é caracterizado por fibras grossas, altamente birrefringentes e de coloração amarela ou vermelha. Já o colágeno Tipo III apresenta fibras mais finas de baixa birrefringência e coloração verde (MONTES, 1996; ORTEGA et al, 2003).

JUNQUEIRA et al. (1979) afirmam que quando o ácido pícrico não é usado, constata-se que todas as estruturas mostram intensificação da birrefringência. É importante assinalar que o uso da solução de Picrosírius Red, associado à microscopia polarizada, apresenta importante sensibilidade e especificidade como método simples para localizar as fibras colágenas (RABAU; DAYAN, 1994). Pode-se distinguir em padrões de cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras do colágeno, diferentes tipos de colágenos (HIRSHBERG et al., 1999).

A falha na colagenólise dos placentomas é proposta por muitos autores como um fator fundamental de Retenção Placentária (RP). Vacas com RP apresentam uma colagenólise e proteólise diminuídas (MELENDEZ et al., 2006), ou um sistema anti-colagenase mais ativo (EILER; HOPKINS, 1993), sendo incapazes de degradar o colágeno do tipo III, que diminui significativamente em vacas normais no final da gestação (SHARPE et al., 1990).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho objetivou avaliar quantitativamente o número e área de vasos nos componentes materno e fetal da placenta, e a proporção de colágeno tipo I e III em diferentes idades gestacionais. Avaliou-se também a imunexpressão das Caspases 3 e 8, do Bax e do Bid em células trofoblásticas binucleadas e demais células do placentoma, correlacionando estes dados com os períodos de 3, 6 e 9 meses de gestação.

Objetivos específicos

Quantificar histomorfometricamente a expressão *in situ* de caspase iniciadora (caspase 8) via imunistoquímica no trofoblasto e demais células placentárias de vacas em diferentes idades gestacionais;

Quantificar histomorfometricamente a expressão *in situ* de caspase efetora (caspase 3) via imunistoquímica no trofoblasto e demais células placentárias de vacas em diferentes idades gestacionais;

Quantificar histomorfometricamente a expressão *in situ* de proteínas pró apoptóticas da família Bcl-2 (Bax e Bid) via imunistoquímica no trofoblasto e demais células placentárias de vacas em diferentes idades gestacionais;

Quantificar histomorfometricamente a expressão *in situ* de proteínas anti apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2) via imunistoquímica no trofoblasto e demais células placentárias de vacas em diferentes idades gestacionais.

Quantificar histomorfometricamente a dissociação das fibras do estroma de vilosidades coriônicas e a hiperemia dos placentomas (número e área de vasos da placenta).

Avaliar histomorfometricamente o colágeno tipo I e III.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Estudou-se, num ensaio duplo cego, os placentomas de 15 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 foram processadas rotineiramente para histologia, imunoistoquímica e histoquímica.

Processamento histopatológico

As amostras foram seccionadas em micrótomo com espessura de 5µm, utilizando-se navalhas descartáveis. Após obtenção dos cortes, as lâminas foram submetidas ao método de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

As lâminas coradas em HE foram utilizadas para determinação do índice apoptótico, análise de vasos e a dissociação das fibras do estroma das vilosidades. Determinou-se o índice apoptótico (IA= somatório das células em apoptose/somatório das células totais x 100). Na quantificação do IA, foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentavam pelo menos três dos critérios morfológicos de inclusão (VASCONCELOS; VASCONCELOS 1996).

Coloração de Picrosirius-red

A análise estereológica das fibras colágenas tipo I e tipo III dos placentomas foi realizada a partir da observação das lâminas histológicas coradas através da técnica histoquímica Tricrômico de Picrosírius.

Quando observados com filtros polarizadores os cortes evidenciam especificamente as fibras de colágeno e permitem, ainda, a diferenciação destas fibras principalmente em tipo I (em vermelho ou amarelo) e III (verde).

O método de Tricrômico de Picrosirius consiste basicamente na coloração da proteína colágeno. As fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja, amarelo e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III. Serão avaliados os 3 melhores campos do placentomas, com ampliação de 100x para a quantificação de colágeno tipo I e III corados com Picrosírius, analisados em microscopia com luz polarizada e morfometricamente com ajuda do *Image Pro-Plus* versão 4.5.0.29 para Windows®, *Media Cybernetics Inc*, EUA.

Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica das amostras, as mesmas foram cortadas em secções de 5 µm de espessura e posteriormente montadas em lâminas previamente banhadas em gelatina, que possui a função de aderir os cortes à lâmina. Para a incubação com o anticorpo anti-Caspase 3 clone JHM62 (*Mouse Monoclonal* CPP32, Novocastra TM) na diluição de 1:200 e anti-Caspase 8 clone 11B6 (*Mouse Monoclonal* CASP-8, Novocastra TM) na diluição de 1:200, as lâminas foram submetidas a banhos de xilol I por 30 minutos, xilol II por 30 minutos e xilol III por 20 minutos, seguidas de incubação em série decrescente de etanol

(100%, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos e lavadas em 3 banhos de PBS pH 7,4. Para a recuperação antigênica as lamínas foram submetidas à recuperação antigênica enzimática, sendo incubadas à temperatura ambiente, utilizando solução de proteinase K (Proteinase K, Dako®, Dinamarca) por 5 minutos. Após a recuperação antigênica, as lamínas foram lavadas em 3 banhos com PBS e então, submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com utilização de solução de metanol e peróxido de hidrogênio 10 volumes (9:1), realizando 3 banhos de 20 minutos cada. As lâminas foram lavadas com 3 banhos de PBS de 5 minutos cada. O bloqueio das ligações inespecíficas endógenas foi feito com leite em pó Molico® 12g/200 mL de PBS por 60 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para Caspase 3 e 8, na diluição de 1:200 para ambas, em câmara úmida overnight à 4° C. Os anticorpos foram diluídos em PBS.

As lâminas foram lavadas em 3 banhos de PBS por 5 minutos cada. Logo após este procedimento, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário em temperatura ambiente por 1 hora. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de PBS por 5 minutos cada. A solução estreptavidina-biotina (Kit Dako®) foi aplicada sobre os cortes permanecendo por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de PBS por 5 minutos cada. Como solução reveladora foi utilizado um kit Dako de DAB (diaminobenzidina) líquida (1ml do tampão do kit, 1 gota de DAB) que foi aplicada sobre os cortes por 1 minuto. As lâminas passaram por 3 banhos de PBS. Para contra coloração foi utilizado Hematoxilina aplicada sobre os cortes e permanecendo 6 minutos e então lavadas com 2 banhos de água destilada. As lamínas foram incubadas em soluções crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) por 3 minutos, xilol por 5 minutos e montadas com lamínula de vidro e Entellan® (Merck Millipore, Brasil).

Para a reação imunoistoquímica com o anticorpo anti- Bax e anti- Bid, empregou-se o mesmo protocolo, utilizando-se como anticorpo primário anti-Bax (*Polyclonal Rabbit Anti-Human Bax*, Dako®, Dinamarca) na diluição de 1:50, e anticorpo primário anti-Bid (*Rabbit Polyclonal anti-Bid*, Chemicon, CA, EUA) na diluição de 1:100. Além disso, a solução de recuperação antigênica foi trocada por ácido cítrico 10mM pH 6.0 em banho úmido por 30 minutos a 96°C, conforme recomendado pelo fabricante.

Utilizou-se o mesmo protocolo já descrito, para o anticorpo anti-Bcl-2, utilizando-se como anticorpo primário anti-Bcl-2 (*Monoclonal mouse anti-human Bcl2 Oncoprotein clone 124*, Dako®, Dinamarca) na diluição de 1:200. Além disso, a solução de recuperação antigênica foi trocada por Tris EDTA pH 8,0 (Tris HCL 0,152g, Tris Base 1,094g, EDTA 3,36g em 1000ml de água destilada), conforme recomendado pelo fabricante.

Para controle positivo, foram utilizadas amostras de timo de camundongos (Figura 1 e 2). Como controle negativo das reações, as amostras foram incubadas com PBS em substituição do anticorpo primário (Figura 2 e 3).

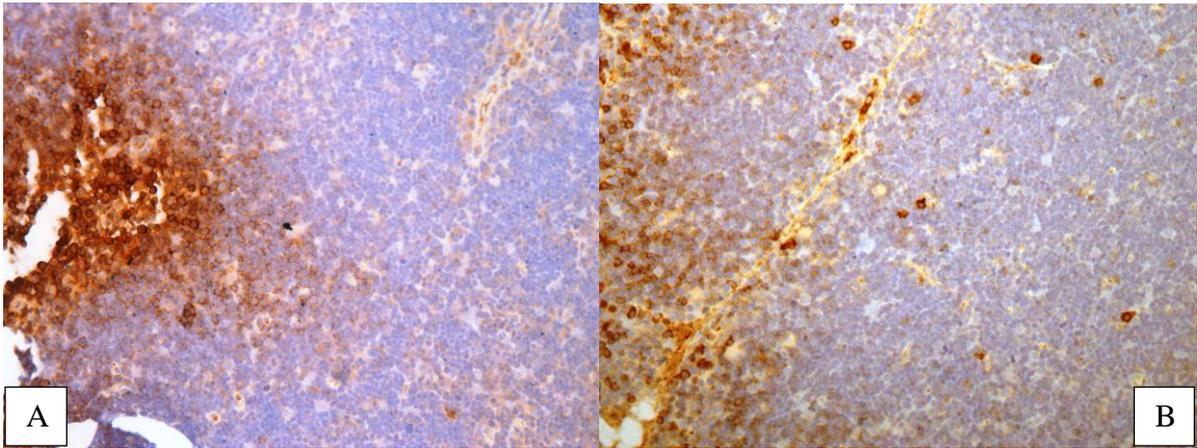


Figura 1- Timo de camundongos. A: Controle positivo de anti-Bax, na diluição de 1:50. B: Controle positivo de anti-Bid na diluição de 1:100. Complexo estreptavidina-peroxidase, 20x.

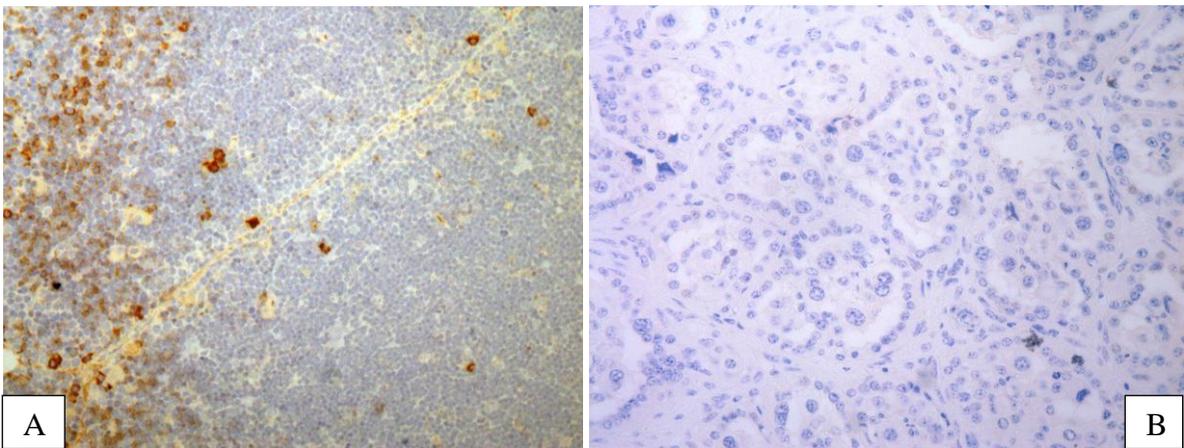


Figura 2- A: Timo de camundongo, controle positivo anti-Bcl-2, na diluição de 1:50. Complexo estreptavidina-peroxidase, 20x. B: Controle negativo para a reação com o anticorpo Bcl-2 em placenta de vaca, 40x.

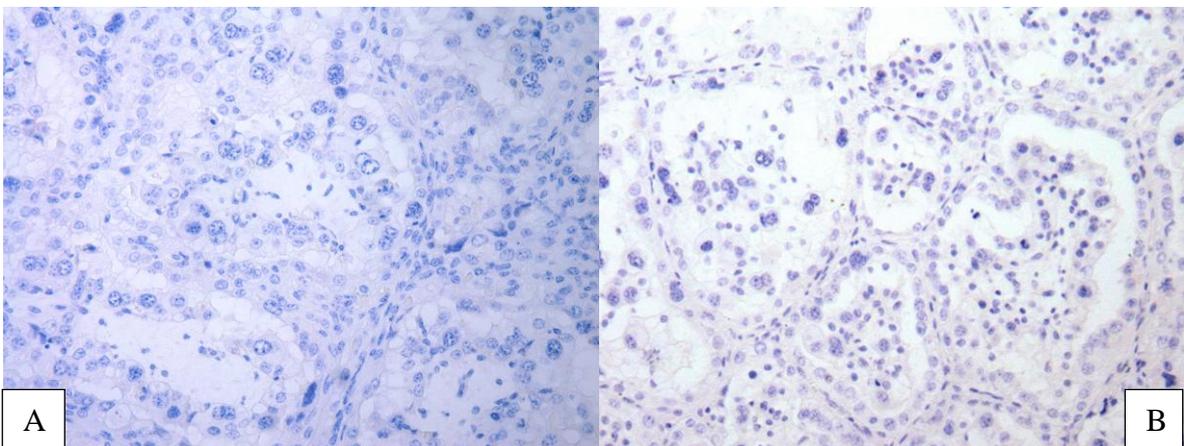


Figura 3- Controles negativos em placentas bovinas (sem o anticorpo primário). A: Anti-Bax. B: Anti-Bid. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.

Morfometria

Os fragmentos foram analisados em microscópio ótico para contagem e localização das células ou estruturas marcadas. Para tanto, as imagens foram capturadas câmara fotográfica (JVC TK-1270/JCB) acoplada a microscópio ótico Olympus BX43, digitalizadas e posteriormente analisadas com auxílio de programa computacional de análise de imagens (*Image Pro-Plus versão 4.5.0.29 para Windows®*, Media Cybernetics Inc, EUA). Os resultados da quantidade, frequência e distribuição dos componentes ou células avaliados, foram comparados entre os três grupos e análise estatística pertinente realizada.

Utilizou-se como critérios de exclusão a presença de artefatos de processamento (fraturas, áreas de retração do parênquima) ou qualquer outra com áreas claras ou não preenchidas no campo. Assim, selecionou-se campos histológicos em que se observavam claramente boas evidências dos parâmetros a serem analisados.

Para a estimativa da celularidade, considerou-se os núcleos de todos os tipos celulares presentes em meio aos componentes maternos e fetais do placentoma (células binucleadas, trofoblastos, fibroblastos e células endoteliais).

A quantificação da porcentagem das áreas vasculares (parâmetro para avaliação da hiperemia) e da dissociação das fibras do estroma foi realizada avaliando-se 8 campos/animal. Para tal, foi necessária a homogeneização do brilho e coloração (padronização do contraste) em todas as imagens selecionadas para esta análise morfométrica.

Parâmetros e análise morfométrica

A imunomarcagem para cada antígeno alvo foi quantificada morfometricamente e o índice resultante foi obtido representando a proporção das células marcadas sobre as células totais (Ex: IBcl-2= somatório das células imunomarcadas com o anticorpo anti Bcl-2/somatório

das células totais x 100).

A quantificação da imunomarcção foi realizada em campos histológicos obtidos em objetiva planacromática de 40x. Na quantificação das imunomarcções, foram consideradas células positivas para o antígeno em questão as imunomarcadas de maneira inequívoca e cristalina. Na avaliação da razão Bax/Bcl-2 utilizou-se a medida de tendência central obtida na marcação de Bax dividida pela mesma obtida para Bcl-2.

Determinação do número mínimo representativo de campos histológicos e imunoistoquímicos

O número mínimo de campos representativos foi obtido a partir da avaliação morfométrica de pelo menos cinquenta campos iniciais cujos índices de marcação foram registrados em planilha eletrônica. Posteriormente, por sorteio, foram formados 10 subgrupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35..., retirados aleatoriamente com reposição. Cada subgrupo foi submetido á análise estatística e caracterizada sua média e respectivo coeficiente de variação. O tamanho amostral considerado como mínimo representativo foi o valor em que o incremento do nº de campos não resultou em redução considerável no valor do coeficiente de variação, conforme descrito por MORO *et al.* (2004) com modificações. Este número mínimo representativo de campos histológicos foi utilizado na morfometria de todas as amostras e reações, capturando-se imagens com as objetivas planapocromáticas de 10 (para a área, perímetro, diâmetros extremos dos vasos e Picrosirius red) e 40 vezes (para quantificação das células imunomarcadas maternas e fetais dos placentomas bovinos).

O número mínimo de campo foi realizado para cada parâmetro analisado (índice apoptótico, Bcl-2, Bax, Bid, Caspase 3 e Caspase 8) e apresentou variações, como demonstrado nas figuras a seguir.

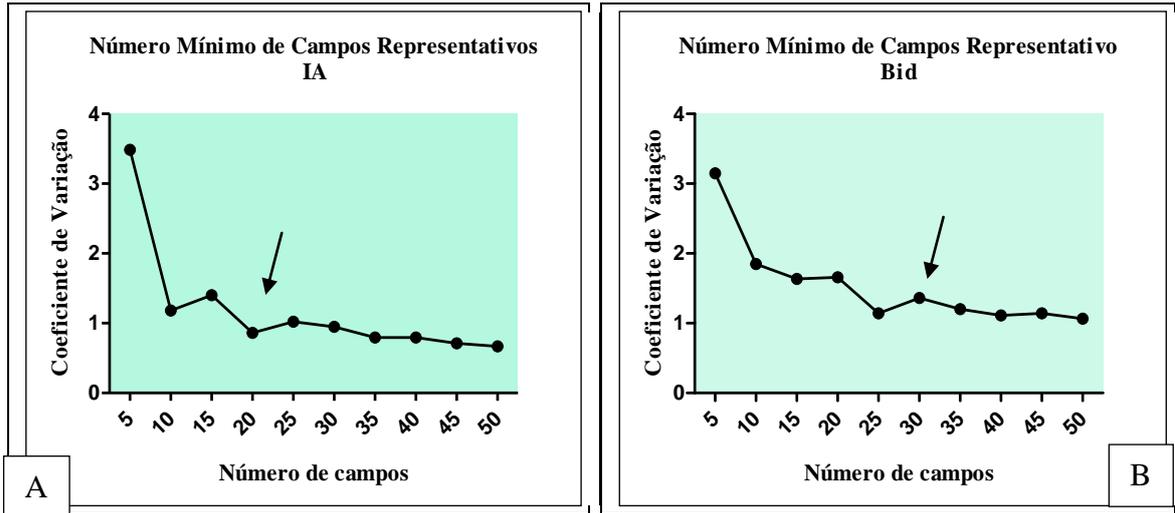


Figura 4 – A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do Índice apoptótico em HE. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcção para o anticorpo anti-Bid.

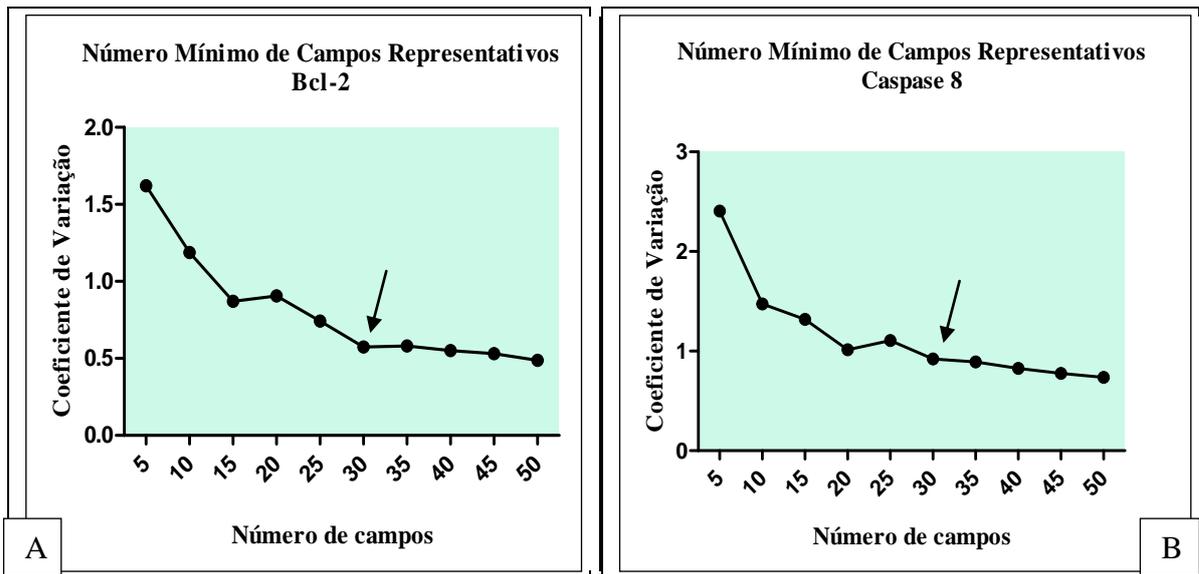


Figura 5 – A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcção para o anticorpo anti-Bcl-2. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcção para o anticorpo anti-caspase 8.

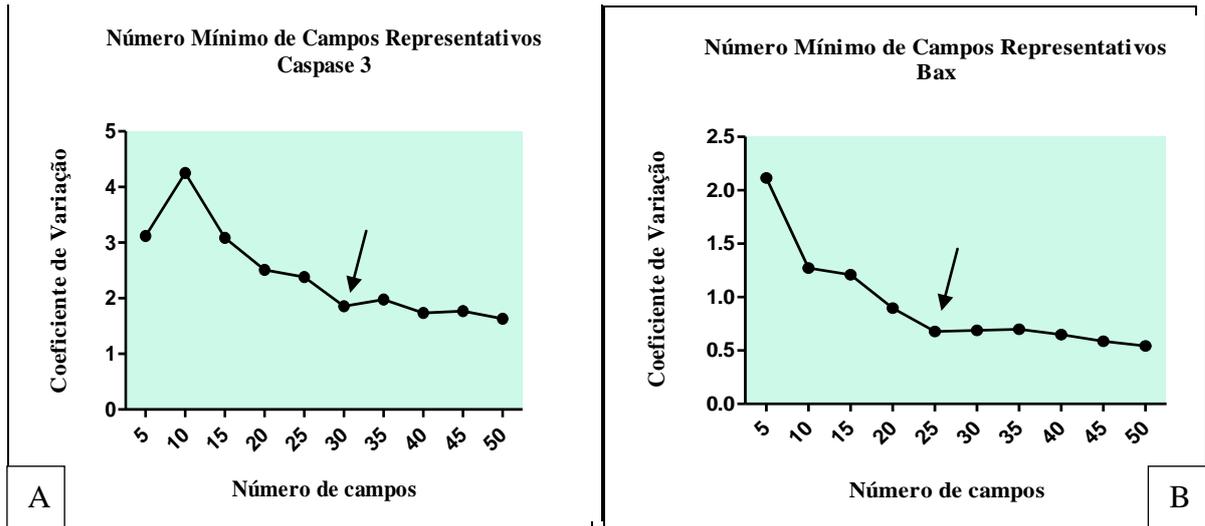


Figura 6 – A: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcção para o anticorpo anti-caspase 3. B: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para a quantificação da % de imunomarcção para o anticorpo anti-Bax.

Delineamento experimental e análise dos resultados

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão ou mediana, conforme tenham apresentado uma distribuição normal ou não, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando a distribuição era normal utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para avaliar eventuais diferenças entre os parâmetros mensurados nos diferentes tempos de gestação e aplicou-se o teste de Newnam Keuls para comparar os grupos entre si. Quando a distribuição dos dados não demonstrava normalidade, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado e o pós-teste de Dunn's utilizado para múltipla comparação. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 5.

REFERÊNCIAS

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

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

ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K.M.A.; FOELLMER, H.; RUTHERFORD, T.; MOR, G. Differential regulation and function of the Fas/FasL ligand system in human trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, n.6, p. 1853-61, 2002.

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

BALDWIN, R.L.; TRAN, H.; KARLAN, B.Y. Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. **Gynecologic Oncology**, v.74, n.2, p.265-71, 1999.

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

BERTOLINI, M.; WALLACE, C.R.; ANDERSON, G.B. Expression profile and protein levels of placental products as indirect measures of placental function in vitro-derived bovine pregnancies. **Reproduction**, v.131, p.163-173, 2006.

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, n. 4, p. 469–480. 2003.

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

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v.326 (1), p. 1–16, 1997.

CROCKER, L.P.; COOPER, S.; ONG, S.C.; BAKER, P. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. **American Journal of Pathology**, v. 162, n.2., p. 637-43, 2003.

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

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

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

EILER H.; HOPKINS F.M. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, p. 436-443, 1993.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p. 495-516, 2007.

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

GREEN, D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. **Immunology Review**., v.193, p.5-9, 2003.

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

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

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

GRUNERT E, BIRGEL EH. **Obstetrícia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 323p., 1989.

GRUNERT, E., BIRGEL E. H., VALE W. G., et al. **Patologia e clinica da reprodução dos animais mamíferos domésticos**, São Paulo, Varela, p. 170-175, 2005.

GUTIERREZ, A.A.; ARIAS, J.M.; GARCIA, L.; MAS-OLIVA, J.; GUERRERO-HERNANDEZ, A. Activation of a Ca²⁺ permeable cat ion channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line. **The Journal of Physiology**, v.15, n.517, p. 95-107, 1999.

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

HEAZELL, A.E.P.; CROCKER, I.P. Live and let die – Regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. **Placenta**, v.29, n.9, p. 772-83. 2008.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, n. 407, p. 770-776, 2000.

HIRSHBERG, A.; SHERMAN, S.; BUCHNER, A. et al. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.28, p. 410-2, 1999.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J.C.P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 195, n.1, p. 29-39, 2006.

IGWEBUIKE, U.M. Trophoblast cells of ruminant placentas – A minireview. **Animal Reproduction Science**, p. 2-13, 2005.

JAMES, E.R.; GREEN, D.R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. **Trends in Parasitology**, v.20, n.6, p.280-7, 2004.

JEFFREY, J. J., EHLICH, L. S., ROSWIT, W. T. Serotonin: An inducer of collagenase in

miometrial smooth muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 146, n. 3, p. 399-406, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.U, BIGNOLAS, G., BRENTANI R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, p.11, p. 447-455, 1979.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. **The Journal of Pathology**, v.107, p.41-44, 1972.

KIM, J.; A.H.N., AHN, M.; JUN, H.; RYN, J.; MIN, D. Toxoplasma gondii inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF- κ B activation. **Yonsei Medical Journal**, Korea, v.47, n.6, p. 862-9, 2006.

KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, p.95-100, 1980.

KLISCH, K.; HECHT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMAN, B., LEISER, R. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 20, p. 451-458, 1999.

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

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

LEVY, R.; NELSON, D.M. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. **Placenta**, v.21, n.1, p.1-13, 2000.

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

MARQUES JÚNIOR, A. P. **Leucocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta**. 1988. 182 f. Thesis (PhD in Pathology) – Postgraduate Program in Veterinary Science, University of Illinois, Urbana, 1988.

MARQUES JÚNIOR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B.; SATURNINO, H.M. Aspectos morfológicos da placenta de vacas zebu (*Bos taurus indicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.213-219, 1993.

MARTINS V.M.V., MARQUES JUNIOR A.P., VASCONCELOS A.C., MARTINS E., SANTOS, R.L. & LIMA F.P.C. Maturação e expulsão placentária em vacas das raças Holandesa e Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p. 157-167, 2004.

MARTINS, E. **Apoptose na maturação e eliminação placentária em *Bos taurus taurus***. 1999. 134 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

MELLENDEZ, P., GONZALEZ, G., BENZAQUEN, M., RISCO, C. & ARCHBALD, L. The effect of a monensin controlled-release capsule on the incidence of retained fetal membranes, milk yield and reproductive responses in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 66, p.234-241, 2006.

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

MINKO, T.; KOPECKOVÁ, P.; KOPECEK, J. Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HEMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. **Journal of Controlled Release**, n. 71, p. 227-237, 2001.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.3, p.125-128, 2004.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n.1, 15-27 p., 1996.

MORAIS-PINTO, L. **Caracterização da célula binucleada e placentas de vacas Nelore (*Bos indicus* LINNAEUS, 1758)**, 2002. 86f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2002.

MORO, L.; VASCONCELOS, A.C.; SANTOS, F.G.A.; ALVES, C.M.; NUNES, J.E.S.; SAMPAIO, I.B.M. Determination of the minimal representative number of microscopic fields

to quantify apoptosis in canine lymph nodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.408-10, 2004.

NODEN, D.M.; De LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals**. Baltimore: Williams & Wilkins, 274p., 1985.

NUNES J.E.S., VASCONCELOS A.C., MARTINS E. et al. Maturação e liberação placentária em bovinos e sua relação com apoptose. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 513-525, 2001.

OPFERMAN, J.T.; KORSMEYER, S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology**, v.4, n.5, p. 410-5, 2003.

ORTEGA, H.H.; MUÑOZ-DE-TORO, M.M.; LUQUE, E.H.; MONTES, G.S. Morphological characteristics of the interpubic joint (Symphysis pubica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations – a comparative study. **Cells Tissues Organs**. v.173, p. 105-144, 2003.

OW, Y.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.7, p. 532-42, 2008.

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.

PINTO, L.M. **Caracterização da célula binucleada na placenta de vaca nelore (Bos indicus-Linnaeus, 1758)**. 2002. 87p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. Guanabara Koogan, 241p, 2006.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. **Histology and Histopathology**, v. 9(3), p. 525-528, 1994.

RAJASHEKHAR, G.; LOGANATH, A.; ROY, A.C.; MONGELLI, J.M. Resistance to Fas-mediated cell death in BeWo and NJG choriocarcinoma cell lines: implications in immune

privilege. **Gynecologic Oncology**, v. 91, n.1, p. 89-100, 2003.

RANGO, U.V. Fetal tolerance in human pregnancy – A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters**, v. 115, n.1, p.21-32, 2008.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.157, n.5, p.1415-30, 2000.

ROBERTIS, E.D.P.; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SANTOS RL, MARQUES JR AP. Histoquantitative studies of the placentomes of milking cows with placental release and retention. **Veterinária Notícias**, v. 4, p. 39-42, 1998.

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

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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, n.3, p.240-242, 1997.

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

SHARPE, K.L., EILER, H., HOPKINS, F.M..Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. **Biology of Reproduction**. v.43, p. 229-235, 1990.

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

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

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1387, p. 17-31, 1998.

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

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.3, p.231-41, 2008.

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

VASCONCELOS, A.C. & VASCONCELOS, M.M.A. Apoptose ou morte celular programada: um novo conceito em patologia? **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 5, p. 103-108, 1996.

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

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

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

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

WOODING, F.B.; MORGAN, G.; ADAM, C.L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. **Microscopy Research Techniques**, v.38, p.88-99, 1997.

XIANG, J.; CHAO, D.T.; KORSMEYERS, S.J. BAZ-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.93, p.14559-14563, 1996.

Artigo submetido a Pesquisa Veterinária Brasileira, 13 de dezembro de 2013 sob o Nº 3667 MF.

CAPÍTULO 2

APOPTOSE E MATURAÇÃO PLACENTÁRIA BOVINA: UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO¹

Tatiane F. Carvalho², Núbia Braga Pereira², Camila Raianna Justiniana Rocha², Camila Couto Figueiredo², Milene Alvarenga Rachid² e Anilton C. Vasconcelos²

ABSTRACT.- Carvalho T.F., Pereira N.B. Rocha C.R.J., Figueiredo C.C., Rachid M.A. & Vasconcelos A.C. 2013. [**Apoptosis and maturation placental bovine: An immunohistochemical and morphometric study.**] Apoptose e maturação placentária bovina: um estudo imunoistoquímico e morfométrico. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0): 00:00. Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. E-mail: carvalhotativet@hotmail.com

Placental Release after birth involves loss of maternal-fetal adhesion and occurs only after complete maturation of the placentome which is related to the decrease in cellularity of fetal and maternal tissues. Apoptosis is required for both the normal maturation and release of the placenta after birth. The aim of this study was to evaluate the occurrence of apoptosis in samples of placenta of cows in different stages of gestation. Samples of 15 healthy cows placentomas 4 (n = 5), 6 (n = 5) and 9 (n = 5) months of gestation were harvested and processed for routine histology, immunohistochemistry and histochemistry. The slides were stained with HE, Picrosirius Red and subjected to immunohistochemical analysis of proteins Caspase 3, Caspase 8, Bax and Bid. Increase in number of vessels were not associated to increase in vascular area, during progression of gestation. The results of histomorphometry revealed increased labeling for Bax and Caspases 3 and 8 in trophoblastic binucleated cells in late pregnancy, where the Bid remained without significant change. Histomorphometry analyzing the mononuclear trophoblast cells showed a high expression for Bax in early pregnancy, but decreased at 6 months of gestation. Immunolabeling revealed increased Caspases 3/8 and Bid with advancing of gestation. Further evaluation of type I and III collagens showed a decrease of both types of collagens at the end of gestation, which is very important for the reduction of maternal-fetal adhesion. These results confirm that Caspases 3 and 8 and Bax are involved in the mechanisms of activation of apoptosis through mitochondrial intrinsic and or extrinsic pathway during pregnancy in trophoblastic binucleated cells. In mononuclear trophoblast cells Bax loses importance in the apoptosis process, awhile Bid and caspases 3 and 8 become the most significant.

INDEX TERMS: Placental maturation, apoptosis, immunohistochemistry, Caspase 3, Caspase 8, Bid, Bax, cattle.

RESUMO.- A liberação da placenta após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação completa do placentoma, que está relacionada com a diminuição da celularidade dos tecidos fetal e materno. A apoptose é requerida tanto para a maturação quanto para a liberação normal da placenta após o parto. 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, imunistoquímica e histoquímica. As lâminas obtidas foram coradas em HE, Picosirius Red e submetidas à análise imunistoquímica das proteínas Caspase 3, Caspase 8, Bax e Bid. O aumento no número de vasos não necessariamente se associou ao aumento do calibre destes durante a evolução da gestação. Os resultados de histomorfometria revelaram aumento da marcação para Bax e Caspases 3 e 8 em células trofoblásticas binucleadas no final da gestação, enquanto o Bid se manteve sem alteração significativa. A histomorfometria das células trofoblásticas mononucleadas revelou expressão alta para Bax no início de gestação, com diminuição aos 6 meses de gestação e aumento das imunomarcações para Caspases 3 e 8, e Bid com o avanço gestacional. Os colágenos tipo I e III não aumentaram do terço médio ao final da gestação, o que é importante para a diminuição da adesão materno-fetal. Esses resultados confirmam que as Caspases 3 e 8, e o Bax estão envolvidos nos mecanismos de ativação da apoptose pela via intrínseca mitocondrial e/ou extrínseca ao longo da gestação em células trofoblásticas binucleadas, e que nas células trofoblásticas mononucleadas o Bax deixa de ser importante, enquanto o Bid e as Caspases 3 e 8 se tornam os mais significativos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Maturação placentária, apoptose, imunistoquímica, Caspase 3, Caspase 8, Bid, Bax, bovinos.

INTRODUÇÃO

A placenta bovina é classificada como cotiledonária, pela presença de regiões específicas de trocas, os chamados placentomas, compostos pela carúncula materna e pelo cotilédone fetal. O crescimento e desenvolvimento normal dos placentomas são essenciais para o desenvolvimento e crescimento fetais (Laven & Peters 2001). A liberação da placenta após o parto envolve a perda da adesão materno-fetal e ocorre somente após a maturação completa do placentoma que está relacionada com a diminuição da população celular dos tecidos fetal e materno (Mallard *et al.* 1996). Estudos mostram que a apoptose está envolvida tanto na maturação quanto para a liberação normal da placenta após o parto (Nunes *et al.* 2001, Martins *et al.* 2004). No momento do parto, a apoptose nas células do placentoma é mais intensa e pode estar associada à mudanças hormonais (Martins *et al.* 2004).

A apoptose é um tipo de morte celular programada ativada por genes que codificam endonucleases e proteases para a morte da célula (Saraste & Pulkki 2000). Existem duas vias distintas que podem estar ativas. Na via extrínseca a apoptose é iniciada via receptores de morte, ativando a pró-caspase-8 ou -10 (Hengartner 2000). Na via intrínseca ou mitocondrial, ativada com as alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial ocorre a liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9

(iniciadora) cliva as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10)(Anazetti *et al.* 2003). A via mitocondrial é ativada em resposta a danos no DNA, que ativam membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró- e anti apoptóticos da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial e o extravasamento do citocromo c para o citosol (Gottlieb 2000). Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e na apoptose (Anuradha *et al.* 2001).

A remodelação dos componentes do estroma materno e a manutenção do formato dos placentomas envolve a participação de macrófagos. Esse processo ocorre durante toda a gestação, diminuindo a fixação do tecido fetal no materno ao final para liberação das membranas fetais após o parto (Miyoshi & Sawamukai 2004).

Diversos fatores ou componentes do placentoma são importantes na maturação placentária em bovinos. Nesse estudo visa-se a ampliação de conhecimentos sobre as mudanças estruturais na placenta no seu desenvolvimento e maturação, considerando as consequências econômicas de sua retenção. Nesse contexto, a análise imunoistoquímica associada a morfometria deverá permitir o detalhamento numérico das células imunomarcadas no placentoma bovino em diferentes momentos da gestação.

Este trabalho objetivou avaliar quantitativamente o número e área de vasos nos componentes materno e fetal da placenta, e a proporção de colágeno tipo I e III em diferentes idades gestacionais. Avaliou-se também a imunoexpressão das Caspases 3 e 8, do Bax e do Bid em células trofoblásticas binucleadas e demais células do placentoma, correlacionando estes dados com a idade gestacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental: Foram utilizadas 15 placentas de vacas mestiças adultas 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 4 meses de gestação; enquanto os Grupos II e III por placentomas de vacas com 6 e 9 meses de gestação, respectivamente. A estimativa da idade gestacional foi calculada pelo comprimento craniocaudal (CRL) do feto (Noakes 1990).

Análise histopatológica e morfométrica: As amostras foram fixadas em formol tamponado pH 7.4 por 24 horas e processadas para inclusão em parafina. Secções de 5µm foram realizadas para análise histológica, imunoistoquímica e histoquímica. As lâminas foram coradas em HE (Hematoxilina e Eosina) para determinação do número e área de vasos, em Picrosirius Red para análise dos colágenos tipo I e III e submetidas à reação de imunoistoquímica das proteínas Bid, Bax e Caspases 3 e 8. Os fragmentos foram analisados em microscópio ótico para contagem e localização das células ou estruturas marcadas. Para tanto, as imagens foram capturadas câmera digital (JVC TK-1270/JCB) acoplada a microscópio ótico (Olympus BX43) e posteriormente analisadas com programa de análise de imagens *Media Cybernetics Image Pro-Plus* versão 4.5.0.29 para Windows®.

A análise das fibras colágenas tipo I e tipo III dos placentomas foi realizada a partir da observação das lâminas coradas com Picrosírius Red. Foram capturados 3 campos/lâmina por animal, em objetiva planocromática de 10x com luz polarizada. A

quantificação dos colágenos tipo I e tipo III foi através da área de colágeno (unidade, μM^2).

A quantificação do número e área de vasos foi realizada a partir da observação das lâminas coradas com HE. Foram capturados 8 campos/lâmina para cada animal, em objetiva planocromática em 10x.

Análise imunoistoquímica: Seções histológicas de placentomas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio das peroxidases endógenas. Após a lavagem por cinco minutos com tampão fosfato (PBS), as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica conforme padronizado para cada anticorpo. Para as Caspases 3 e 8 utilizou-se a solução de Proteinase K (*Proteinase K, Dako Corp., Carpinteria, CA*) por 5 minutos e para Bid e Bax a solução de Ácido cítrico 10mM pH 6.0 em banho úmido por 30 minutos a 96°C. O bloqueio das ligações inespecíficas endógenas foi feito com leite desnatado 5% (Molico® - Indústria Brasileira). Os cortes foram incubados câmara úmida “overnight” com os anticorpos primários nas diluições de 1:200 para Caspases 3 e 8, de 1:50 para anti Bax e de 1:100 para anti Bid. Os anticorpos foram diluídos em PBS. Utilizaram-se os anticorpos: anti-Caspase 3 clone JHM62 (*Mouse Monoclonal CPP32, Novocastra TM*), anti-Caspase 8 clone 11B6 (*Mouse Monoclonal CASP-8, Novocastra TM*), anti-Bax (*Polyclonal Rabbit Anti-Human Bax, Dako®, Dinamarca*), e anti-Bid (*Rabbit Polyclonal anti-Bid, Chemicon, CA, EUA*). Posteriormente as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA*) em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida incubou-se com a solução estreptavidina-biotina (*DAKO Corp., Carpinteria, CA*) permanecendo por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (*DAB, Dako Corp., Carpinteria, CA*) e todas as seções foram contracoradas com Hematoxilina de Harris.

As imagens dos campos contendo as imunomarcações foram capturadas com objetiva planocromática de 40x. A imunomarcação para cada antígeno alvo foi quantificada morfometricamente obtendo-se um índice de marcação representando a proporção das células marcadas sobre as células totais (Ex: IBax= somatório das células imunomarcadas com o anticorpo anti Bax/somatório das células totais x 100).

As imunomarcações foram quantificadas em um número mínimo representativo de campos definido pela avaliação da evolução dos erros padrões de acordo com o aumento da amostragem (Moro et al. 2004). Brevemente, determinou-se o Índice de marcação a partir da contagem de células no número máximo obtido de campos tomados numa lâmina. Desses, formaram-se subamostras crescentes de campos (5, 10, 15..., etc) sorteados com reposição. Essas subamostras foram caracterizadas por suas médias e respectivos erros padrões. Plotou-se um gráfico da evolução dos erros padrões com o aumento do número de campos. Quando o erro padrão não diminuía acompanhando o aumento do número de campos se obtinha o número mínimo representativo de campos para cada parâmetro a ser analisado imunoistoquimicamente. Ficou assim estabelecido 25 campos/lâmina para Bax e 30 campos/lâmina para Bid, Caspases 3 e 8.

Para a análise estatística os parâmetros morfométricos obtidos dos diversos campos histológicos foram submetidos ao teste de Kolmogorff-Smirnoff (KS) para verificação de distribuição normal (*Gaussiana*). Quando os dados tinham distribuição *Gaussiana*, procedeu-se à Análise de Variância e à múltipla comparação de Newman

Keuls (SNK). As médias e respectivos erros de cada tratamento foram plotadas em gráfico. Em caso de distribuição dos dados não se encaixar no teste de normalidade, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis acrescido do teste de múltiplas comparações de Dunn, utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 5.1.

RESULTADOS

Achados de número e área de vasos

O número de vasos placentários foi similar entre placentas com 9 e 6 meses de gestação ($5,53 \pm 0,43$ e $5,15 \pm 0,33$, respectivamente), e maior que em placentas com 4 meses de gestação ($4,03 \pm 0,56$, com $p < 0,05$) (Fig. 1A). Assim houve aumento significativo do número de vasos em placentas de 4 para 6 meses de gestação, porém não de 6 para 9 meses. Inversamente a área média dos vasos diminuiu em placentas de 4 para 6 meses de gestação, porém não de 6 para 9 meses (Fig. 1B).

Avaliação histoquímica de colágeno

Os colágenos do tipo I e III aumentaram dos 4 aos 6 meses de gestação. Dos 6 aos 9 meses houve discreta queda, não significativa (Fig. 2 e 3).

Avaliação imunoistoquímica

A reação imunoistoquímica com o anticorpo policlonal para a proteína Bax ocorreu como grumos castanhos no citoplasma das células trofoblásticas no tecido materno e com maior intensidade no tecido fetal (Fig. 4). O percentual de imunomarcagem para Bax nas células trofoblásticas mononucleadas foi maior nas placentas com 4 meses (21,64%) diminuindo no Grupo com 6 meses de gestação (19,08%), que ficou semelhante às placentas com 9 meses de gestação (18,25%) ($p < 0,0002$) (Fig. 5A). Já nas células trofoblásticas binucleadas a marcação para Bax aumentou progressivamente ao longo da gestação estando menor aos 4 meses (0,35%), e maior aos 9 meses (2,68%) ($p < 0,0001$) (Fig. 5B).

Houve ampla marcação imunoistoquímica para a proteína Bid em células trofoblásticas mononucleadas nas amostras com 9 (60,75%) e 4 meses de gestação (51,46%) e menor marcação nas amostras com 6 meses de gestação (49,52%) (Fig. 6 e 7A) ($p < 0,0001$). Nas células trofoblásticas binucleadas a imunomarcagem para Bid aos 4, 6 e 9 meses de gestação foi respectivamente, 3,23%, 2,87% e 3,02%, sem apresentar diferença estatística entre os grupos (Fig. 7B e 8).

A marcação imunoistoquímica para Caspase 3 (Fig. 9) em células trofoblásticas mononucleadas foi menor nas amostras do grupo com 4 meses de gestação (12,27%) e aumentou progressivamente aos 6 e aos 9 meses de gestação (14,98% e 26,43%) respectivamente (Fig. 10A) ($p < 0,0001$). Nas células trofoblásticas binucleadas foi menos intensa, mas seguiu o mesmo padrão, sendo menor no grupo com 4 meses (0,17%) e aumentando progressivamente aos 6 e aos 9 meses de gestação (0,44% e 0,94% respectivamente) (Fig. 10B) ($p < 0,0001$).

A reação imunoistoquímica para a Caspase 8 (Fig. 11) mostrou expressão progressiva aumentando de 4 (12,16%) a 6 (18,41%) e a 9 meses de gestação (23,19%) em células trofoblásticas mononucleadas ($p < 0,0001$) (Fig. 12A). Já nas células trofoblásticas binucleadas só houve diferença entre os extremos, sendo maiores com 9 (1,82%) e menores com 4 meses de gestação (0,83%) ($p < 0,0001$) (Fig. 12B).

DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se as mudanças estruturais na placenta no seu desenvolvimento e maturação. Analisou-se histomorfometricamente o número e área de vasos nos componentes materno e fetal da placenta, e a proporção de colágeno tipo I e III em diferentes idades gestacionais. Além disto quantificou-se a imunexpressão das Caspases 3 e 8, do Bax e do Bid em células trofoblásticas binucleadas e demais células do placentoma, correlacionando estes dados com a idade gestacional.

Houve aumento significativo do número de vasos em placentas de 4 para 6 meses de gestação, porém não de 6 para 9 meses. Inversamente a área média dos vasos diminuiu em placentas de 4 para 6 meses de gestação, porém não de 6 para 9 meses. Assim o aumento no número de vasos não necessariamente se associou ao aumento do calibre destes durante a evolução da gestação. Aos 6 meses de gestação, os vasos placentários estavam aumentando de número e diminuindo de tamanho, indicando maior angiogênese e criação de anastomoses. Não houve aumento da área e número dos vasos no terço final da gestação, o que concorda em parte com os achados de Grunert (1984) como sendo resultado da hialinização das paredes dos vasos sanguíneos, proliferação de tecido conjuntivo da sub-íntima e adventícia, bem como pela obliteração do lúmen dos mesmos.

O número de vasos placentários aumenta com o avanço da gestação. No início da gestação poucos capilares são encontrados no mesênquima, existindo uma evolução na vascularização com o progresso da gestação, conforme relatado por Pinto et al. (2008). A maioria dos trabalhos em placentas em estágios iniciais de gestação e no terço médio evidenciam maior vasculogênese, com a formação de uma rede vascular anastomosada (Cheung et al. 1995), proporcional às necessidades do desenvolvimento fetal (Reynolds & Redmer 2001). Em todos os tipos de placenta existe um crescimento considerável de vasos sanguíneos, garantindo uma potencialização nas trocas entre os organismos materno e fetal (Charnock-Jones et al. 2001). A não expansão da vascularização placentária no terço inicial tem sido associada à mortalidade embrionária precoce (Hill et al. 2000, Charnock-Jones & Burton 2000).

Os colágenos do tipo I e III aumentaram dos 4 aos 6 meses de gestação indicando uma colagenização progressiva das carúnculas até o terço médio da gestação. Dos 6 aos 9 meses houve discreta queda, não significativa. Estes resultados indicam que na placenta bovina em período final de gestação não ocorre mais aumento dos colágenos I e III, apesar do crescimento fetal e da preparação para o parto. Esta esclerose funcional da placenta materna é mais evidente nas zonas marginais da carúncula, especialmente na periferia das criptas (Grunert 1984). Segundo Melendez et al. (2006) no útero normal, há aumento das colagenases e outras proteases, resultando numa quebra massiva de colágeno no final da gestação, e essa degradação é essencial à maturação e conseqüente separação dos placentomas. A falha da colagenólise dos cotilédones é proposta por muitos autores como sendo fundamental na Retenção Placentária (RP). Se o sistema de ancoragem não é enzimaticamente degradado, as membranas fetais ficam retidas. Vacas com RP apresentam uma colagenólise diminuída (Gross et al. 1985, Melendez et al. 2006), ou ainda um sistema anti-colagenase mais ativo (Eiler & Hopkins 1993), sendo incapazes de degradar o colágeno tipo III, que diminui significativamente em vacas normais no final da gestação (Sharpe et al. 1990).

Na avaliação das moléculas envolvidas na maturação placentária associadas com a idade gestacional, a primeira molécula aqui estudada foi o Bax. A reação imunistoquímica com o anticorpo policlonal para a proteína Bax mostrou percentual de imunomarcagem nas células trofoblásticas mononucleadas maior que nas binucleadas, e seguiu um padrão diferente, sendo maior nas placentas com 4 meses e diminuindo aos 6 meses de gestação nas mononucleadas enquanto nas binucleadas era menor aos 4 meses e aumentava progressivamente aos 6 e 9 meses de gestação.

O aumento da expressão de Bax em células binucleadas trofoblásticas em nosso estudo e a subsequente ativação da caspase ativa a apoptose (Sgarbosa et al. 2006) nessas células. Williams et al. (1987) relataram a diminuição progressiva de células trofoblásticas gigantes na vaca ao longo da gestação. O número de células binucleadas diminui somente nas últimas semanas da gestação (Wooding et al. 1993). Quando o número das células binucleadas não diminui no final da gestação aumenta-se as chances de retenção placentária (Santos et al. 1996).

As proteínas da família Bcl-2 são reguladoras da apoptose na placenta, entre eles o Bax pró-apoptótico e Bcl-2 anti-apoptótico (Antonsson et al. 1997, Fleischer & Rebollo 2004). O excesso de Bax formará complexos com Bcl-2 inibindo sua função protetora, enquanto a formação de homodímeros de Bax forma poros na membrana da mitocôndria para a liberação do citocromo-c (Liu et al. 2003). Para Ushizawa et al. (2006) o pico da expressão de Bax pelas células binucleadas ocorre no meio da gestação, discordando das várias evidências de maior apoptose no final da gestação e dos resultados encontrados nesse trabalho, em que a maior expressão de Bax ocorreu aos 9 meses da gestação.

O índice de imunomarcagem da proteína Bid foi maior nas células trofoblásticas mononucleadas de placentas com 9 meses e menor com 4 e 6 meses de gestação. Nas células trofoblásticas binucleadas a imunomarcagem para Bid não apresentou diferença estatística entre os grupos. A imunomarcagem para-Bid foi intensa no epitélio materno em todos os períodos gestacionais avaliados nesse estudo. Proteínas como Bax e Bid são pró-apoptóticas e ativam caspases efetoras (Patel & Gores 1998). A maturação placentária é mediada pela apoptose das células das criptas do epitélio materno e ocorre durante toda a gestação na renovação normal (Boos et al. 2003), aumentando no terço final. Straszewski-Chavez et al. (2005) avaliaram placentas humanas e demonstraram maior apoptose nos sítios de invasão do trofoblasto no epitélio materno, sugerindo que este processo facilite a invasão do trofoblasto e a remodelação dos vilos endometriais.

A imunomarcagem para Caspase 3 em células trofoblásticas mono e binucleadas foi menor aos 4 meses de gestação e aumentou progressivamente aos 6 e aos 9 meses de gestação, sendo menos intensa nas células trofoblásticas binucleadas. Estes resultados indicam que, na fase final da gestação ocorre aumento da apoptose nas células trofoblásticas mono e binucleadas, concordando com o relatado por Martins et al. (2004) e Nunes et al. (2001). A apoptose ocorre na placenta em toda a gestação, mas com maior frequência no período final (Straszewski-Chavez et al. 2004). Benetone (2005) demonstrou maior marcação para caspase 3 e apoptose nas placentas de 9 a 10 meses de gestação comparados com placentas de 2 a 5 meses de gestação. Relacionou a redução da proliferação com o aumento da apoptose com a maturação da placenta e consequente liberação dos anexos fetais após o parto. Liu et al. (2003) relataram aumento da marcação para caspase-3 no sincício e citotrofoblasto ao decorrer da gestação. Padrões crescentes de apoptose na placenta humana durante a gestação

também foi observada e relacionada à constante renovação e remodelação tecidual como um processo natural por Straszewski-Chavez et al. (2005).

A caspase-3 ativada cliva proteínas vitais, como as enzimas reparadoras do DNA e as proteínas do citoesqueleto. Isto explica a morfologia característica das células apoptóticas como condensação nuclear, bolhas na membrana e retração celular. A deoxyribonuclease ativada pela caspase cliva o DNA inespecificamente em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases matando as células (Straszewski-Chavez *et al.* 2005). O aumento do índice apoptótico em placentomas com o avanço da idade gestacional em vacas foi comprovado morfológicamente com a reação de TUNEL por Meça *et al.* (2011).

A Caspase 8 aumentou progressivamente ao longo da gestação nas células trofoblásticas mononucleadas. Já nas células trofoblásticas binucleadas só houve diferença entre o terço inicial e o final da gestação, estando os valores obtidos para 6 meses similares aos com 4 e 9 meses de gestação. O aumento da expressão de caspase 8 ao final da gestação em células trofoblásticas mononucleadas e binucleadas é também relatado por Donovan & Cotter (2004), e reflete a ativação da via extrínseca da apoptose. Meça *et al.* (2010) estudaram placentas bovinas em idades gestacionais de 4, 6 e 9 meses de gestação e observaram a imunoexpressão de caspase 8 nos três períodos analisados.

A ativação de caspase 8 é consequência da ligação de moléculas sinalizadoras com receptores da morte na membrana citoplasmática. A Caspase 8 cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7. Estas caspases efetoras são capazes de clivar uma série de substratos, iniciando a apoptose (Hengartner 2000). Além disso, a ativação da caspase 8 pode levar a uma integração da via extrínseca com a via intrínseca da apoptose através da clivagem da proteína Bid (Wei *et al.* 2000). A proteína Bid truncada (tBid) é capaz de induzir a liberação do citocromo c da mitocôndria e ativar a caspase 9 causando a morte celular (Petros *et al.* 2004, Bras *et al.* 2005, Kutuk & Basaga 2006).

Os resultados da imunoistoquímica, tomados em conjunto, parecem sugerir diferenças na ativação da apoptose para os componentes materno-fetais da placenta bovina, durante a sua maturação. Moléculas comuns às duas vias, como as Caspases 3, são expressas de maneira ascendente e progressivas ao longo da gestação tanto para o componente materno quanto fetal. Merece destaque, no entanto, o fato de nas células trofoblásticas mononucleadas o Bax deixar de ser importante e diminuir ao longo da gestação, enquanto o Bid e as Caspases 3 e 8 se tornam os mais significativos, aumentando progressivamente.

CONCLUSÃO

Bax e Caspases 3 e 8 aumentam de expressão em células trofoblásticas binucleadas no final da gestação, enquanto o Bid se manteve sem alteração significativa. Nas células trofoblásticas mononucleadas Bax aumenta no início de gestação, e diminui aos 6 meses de gestação com o aumento das Caspases 3 e 8 e Bid com o avanço gestacional. Os colágenos tipo I e III e a vascularização não aumentam ao final da gestação, diminui a adesão dos componentes materno-fetais. Esses resultados confirmam que as Caspase 3 e 8 e o Bax estão envolvidos nos mecanismos de ativação da apoptose pela vias intrínseca mitocondrial e/ou extrínseca ao longo da gestação em células trofoblásticas binucleadas, e que nas células trofoblásticas mononucleadas o Bax

deixa de ser importante, enquanto o Bid e as Caspases 3 e 8 se tornam os mais significativos.

Agradecimentos.- Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado e pela FAPEMIG, a quem agradecemos pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Anazetti M.C., Melo P.S., Durán N. & Haun M. 2003. Comparative Cytotoxicity of Dimethylamide-Crotonin in the Promyelocytic Leukemia Cell Line (HL60) and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicol.* 188: 261-274.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S. & Martinou I. 1997. Bernasconi, L.; Bernard, A.; Mermoud, J. J.; Mazzei, G.; Maundrell, K.; Gambale, F.; Sadoul, R.; Martinou, J. C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 277: 370-372.
- Anuradha C.D., Kanno S. & Hirano S. 2001. Oxidative damage to mitochondrial is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL60 cells. *Free Rad. Biol. & Med.* 31:367-373.
- Benetone M.Z. 2005. Apoptose e proliferação na placenta de búfalas. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 186p.
- 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. *Reprod.* 126: 469-480.
- Bras M., Queenan B. & Susin S.A. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochem.* 70(2):231-239.
- Charnock-Jones D.S. & Burton G.J. 2000. Placental vascular morphogenesis. *Bailliere Clin. Obstetr. Gynecol.* 14: 953-968.
- Charnock-Jones D.S., Clark D.E., Licence D., Day K., Wooding F.B.P., Smith, K. 2001. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction.* 122: 753-60.
- Cheung C.Y., Madhu S., Ebaugh M.J. & Brace R.A. 1995. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173 (3): 753-759.
- Donovan M. & Cotter T.G. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Bioch. Bioph. Acta.* 1644:133-147.
- Eiler H. & Hopkins F.M. 1993. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. *JAVMA.* 203: 436-443.
- Fleischer A., Rebollo A. 2004. Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. *FEBS Lett.* 34: 313.
- Gottlieb R.A. 2000. Role of mitochondria in apoptosis. *Crit. Rev. Eukaryot Gen Expr.* 10:231-239.
- Gross T.S., Williams W.F. & Manspecker J.E. 1985. In vitro placental prostaglandin synthesis in the late pregnant and peripartum cow. *Biol. Reprod.* 32: p.154.
- Grunert E. 1984. Placental separation/retention in the bovine. 10th Int. Cong Anim. Reprod. A.I., Illinois-USA, Plenary and Symposia Papers, IV: (XI) 17-24.

- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hill J.R., Burghardt R.C., Jones K., Long C.R., Looney C.R., Shin T., Spencer T.E., Thompson J.A., Winger Q.A. & Westhusin M.E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63: 1787-1794.
- Kutuk O., Basaga H. 2006. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis.* 11:1661-1675.
- Laven R.A., Peters A. R. 2001. Gross morphometry of the bovine placentomes during gestation. *Reprod. Domestic Anim.* 36: 289-296.
- Liu Z., Sun Q.H., Ying Y., Liu J.M. & Peng J.P. 2003. Effect of IFN on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. *Cytokine.* 7: 201-209.
- Malard P.F., Barreto Filho J.B., Santos R.L. & Marques Junior A.P. 1996. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas zebu ao longo da gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48: 553-558.
- Martins V.M.V., Marques Junior A.P., Vasconcelos A.C., Martins E., Santos, R.L. & Lima F.P.C. 2004. Maturação e expulsão placentária em vacas das raças Holandesa e Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56: 157-167.
- 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 estágios de gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(2):258-264.
- Meça K.K.O.L., Puerto H. L. D., Rodrigues L. V., Rachid M. A., Pereira N. B., Cândido M.G.L. & Vasconcelos A. C. 2011. Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidênciação imuno-histoquímica e bioquímica. *Pesq. Vet. Bras.* 31: 718-722.
- Melendez P., Gonzalez G., Benzaquen M., Risco C. & Archbald L. 2006. The effect of a monensin controlled-release capsule on the incidence of retained fetal membranes, milk yield and reproductive responses in Holstein cows. *Theriogenol.* 66: 234-241.
- Miyoshi M. & Sawamukai Y. 2004. Specific Localization of Macrophages in Pregnant Bovine Caruncles. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 125-128.
- Moro L., Vasconcelos A.C., Santos F.G.A., Alves C.M., Nunes J.E.S. & Sampaio I.B.M. 2004. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56: 408-410.
- Noakes D.E. 1990. *Fertilidade e obstetrícia em bovinos.* São Paulo: Varela, 25p.
- Nunes J.E.S., Vasconcelos A.C., Martins E. et al. 2001. Maturação e liberação placentária em bovinos e sua relação com apoptose. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 25: 513-525.
- Patel T. & Gores G.J. 1998. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg.* 4: 42-50.
- Petros A.M., Olejniczak E.T. & Fesik S.W. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Bioch. Biophys. Acta.* 1644:83- 94.
- Pinto L.M., Ambrósio C.E., Teixeira D.G., Araújo K.P.C., Júnior J.R.K., Junior J.C.M., Rici R.E.G., Ferreira G.J.B.C., Martins D.S. & Miglino M.A. 2008. Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (*Bos indicus* Linnaeus, 1758). *Rev Bras. Reprod. Anim.* 32(2):110-121.
- Reynolds L.P. & Redmer D.A. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction, Champaign.* 64:1033-1040.

- Santos R.L., Marques Jr A.P. & Barreto Filho J.B. 1996. Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentônio de vacas leiteiras com liberação normal e retenção de placenta. *Arq Bras Med Vet Zoot*, Belo Horizonte, v. 48, n. 3, p. 317-24.
- Saraste A. & Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45:528-37.
- Sgarbosa F., Barbisan L. F., Brasil M. A., Costa E., Calderon I. M., Gonçalves C. R., Bevilacqua E. & Rudge M. V. 2006. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract.* 73: 143-149.
- Sharpe K.L., Eiler H. & Hopkins, F.M. 1990. Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol. Reprod.* 43: 229-235.
- Straszewski-Chavez S. L., Abrahams V. M. & Mor G. 2005. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr. Rev.* 26: 877-897.
- 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.
- Ushizawa K., Takahashi T., Kaneyama K., Hosoe M. & Hashizume K. 2006. Cloning of the bovine antiapoptotic regulator, BCL2-related protein A1, and its expression in trophoblastic binucleate cells of bovine placenta. *Biol. Reprod.* v. 74, p. 344-351.
- Wei M.C., Zong W.X. Cheng E.H.Y., Lindsen T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J. Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B. & Korsmeyer S.J. 2001. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction. *Science.* 292: 727-730.
- William W.F, Margolis M.J., Manspeaker J, Douglass L. W. & Davidson J.F. 1987. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention, *Theriogenol.* 28: 213-223.
- Wooding F.B.P., Hobbs T., Morgan G., Heap R.B. & Flint A.P. 1993. Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. *J. Reprod. Fertil.* 98: 275-83.

Legenda das figuras

Fig. 1. **(A)** Análise morfométrica do número de vasos em placenta de vaca com 4, 6 e 9 meses de gestação. O número de vasos aumentou de 4 ($4,03 \pm 0,56$) para 6 meses ($5,15 \pm 0,33$), mas não de 6 para 9 meses de gestação ($5,53 \pm 0,43$) com $p < 0,05$. **(B)** Análise morfométrica da área média dos vasos em placentas bovinas com 4, 6 e 9 meses de gestação. A área de vasos foi maior no grupo com 4 meses de gestação ($3,88 \pm 0,25$), diminuindo aos 6 ($3,08 \pm 0,22$) e mantendo-se similar aos 9 meses de gestação ($2,71 \pm 0,18$), com $p < 0,001$.

Fig. 2. Fotomicrografias de placenta de vaca. **(A)** representa o grupo com 4 meses de gestação, com menor concentração de colágeno tipo I e III. **(B)** representa o grupo com 6 meses de gestação, com maior concentração de colágeno tipo I, caracterizado por birrefringência e coloração vermelha, e maior concentração de colágeno tipo III, caracterizado pela reduzida birrefringência e coloração verde. **(C)** representa o

grupo com 9 meses de gestação, com redução do colágeno tipo I e III. Picrosirius Red, microscopia óptica sob luz polarizada, aumento de 10x.

Fig. 3. Médias e erros padrões das áreas de colágenos tipo I e III nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação, obtidos com a coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada. **(A)** A quantidade de colágeno I aumentou de 4 ($0,31\pm 0,17$) aos 6 ($1,78\pm 0,46$), mas não de 6 para 9 ($1,33\pm 0,43$) meses de gestação ($p<0,05$). **(B)** A área de colágeno III aumentou de 4 ($0,26\pm 0,47$) para 6 ($0,92\pm 0,12$) meses de gestação, mas não de 6 para 9 ($0,63\pm 0,97$) ($p<0,05$).

Fig. 4. Placenta bovina mostrando marcação imunoistoquímica para Bax. Áreas acastanhadas no citoplasma definem as marcações imunoreativas. **(A)** Placenta com 4 meses de gestação. **(B)** Placenta com 6 meses de gestação. **(C)** Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x. (*) região materna; (VF) vilo fetal; (setas pretas) células binucleadas; (setas vermelhas) células mononucleadas.

Fig. 5. **(A)** Distribuição do índice de marcação para Bax nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcação diminuiu do grupo com 4 ($21,64\pm 0,64$) para 6 ($19,08\pm 0,53$), mas não de 6 para 9 meses de gestação ($18,25\pm 0,49$), com $p<0,0002$. **(B)** Distribuição do índice de marcação para Bax nas células trofoblásticas binucleadas imunomarcadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($0,35\pm 0,046$) para o de 6 ($1,39\pm 0,12$) e para 9 meses de gestação ($2,68\pm 0,16$), com $p<0,0001$.

Fig. 6. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Bid em células trofoblásticas mononucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta vermelha: célula mononucleada e epitélio materno). **(A)** Placenta com 4 meses de gestação. **(B)** Placenta com 6 meses de gestação. **(C)** Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.

Fig. 7. **(A)** Distribuição do índice de marcação para Bid nas células trofoblásticas mononucleadas imunomarcadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcação aumentou do grupo com 4 meses ($51,46\pm 1,17$) para o com 9 meses de gestação ($60,75\pm 1,06$), mas não para o com 6 meses de gestação ($49,52\pm 1,33$), com $p<0,0001$. **(B)** Distribuição do índice de marcação para Bid nas células trofoblásticas binucleadas imunomarcadas nos grupos com 4 ($3,23\pm 0,23$), 6 ($2,87\pm 0,18$) e 9 ($3,02\pm 0,20$) meses de gestação. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Fig. 8. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Bid em células trofoblásticas binucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta preta: célula binucleada). **(A)** Placenta com 4 meses de gestação. **(B)** Placenta com 6 meses de gestação. **(C)** Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.

Fig. 9. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Caspase 3. Áreas acastanhadas no citoplasma definem marcações imunorreativas (seta vermelha - células mononucleadas; setas pretas: células binucleadas). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.

Fig. 10. (A) Distribuição do índice de marcação para Caspase 3 nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A imunomarcação aumentou progressivamente do 4º mês ($12,27 \pm 0,57$) para o 6º mês ($14,98 \pm 0,49$) e para o 9º mês de gestação ($26,43 \pm 1,10$ com $p < 0,0001$). (B) Distribuição do índice de marcação para Caspase 3 nas células trofoblásticas binucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($0,17 \pm 0,03$) para o de 6 ($0,44 \pm 0,041$) e para 9 meses de gestação ($0,94 \pm 0,07$), com $p < 0,0001$.

Fig. 11. Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Caspase 8. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta preta: célula binucleada e seta vermelha: células mononucleadas e epitélio materno;). (A) Placenta com 4 meses de gestação. (B) Placenta com 6 meses de gestação. (C) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase, 40x.

Fig. 12. (A) Distribuição do índice de marcação para Caspase 8 nas células trofoblásticas mononucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses ($12,16 \pm 1,13$) para o de 6 ($18,41 \pm 1,41$) e para 9 meses de gestação ($23,19 \pm 1,56$), com $p < 0,0001$. (B) Distribuição do índice de marcação para Caspase 8 nas células trofoblásticas binucleadas nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. A marcação aumentou do grupo com 4 meses de gestação ($0,83 \pm 0,15$) aos 9 meses de gestação ($1,82 \pm 0,26$), mas não houve diferença entre o grupo com 6 meses de gestação ($1,05 \pm 0,21$) e os demais ($p < 0,01$).

As Figuras

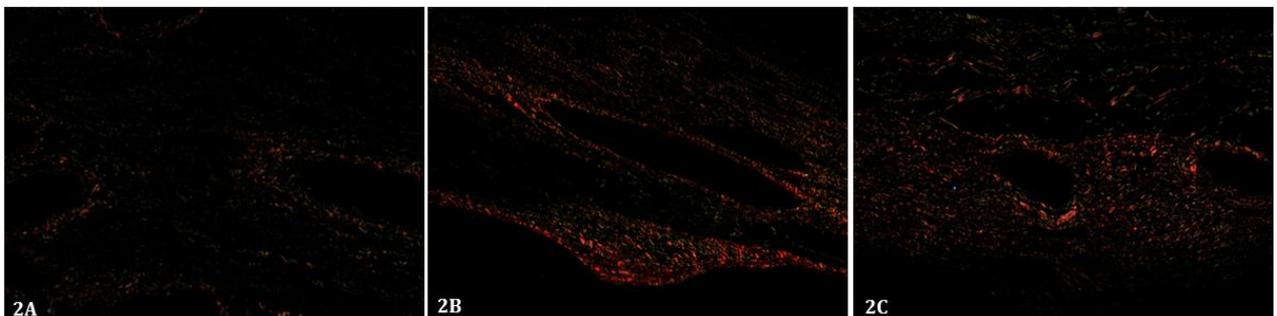


Fig. 2.

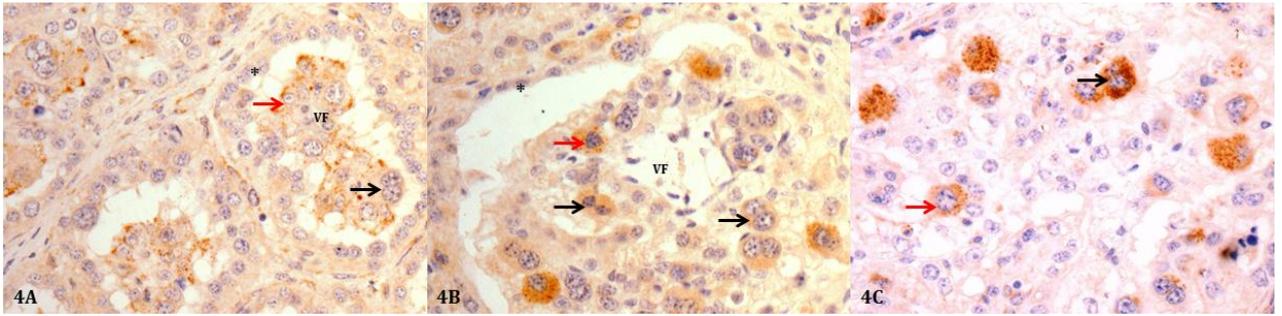


Fig. 4.

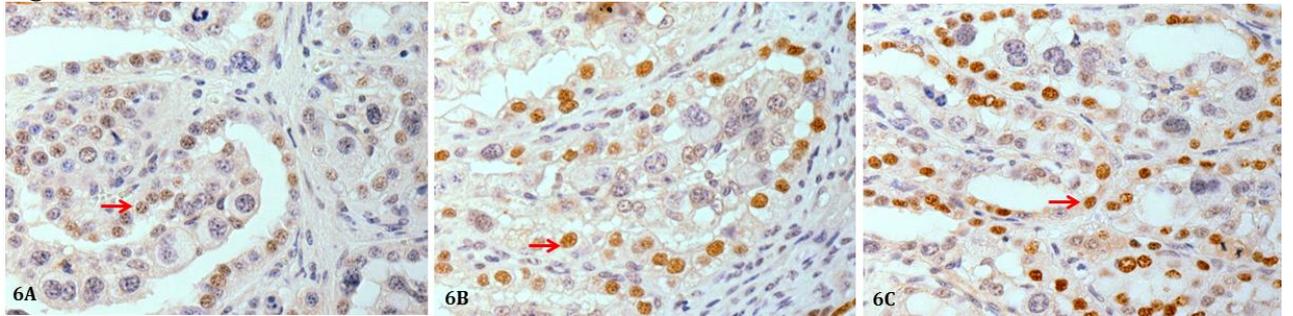


Fig. 6.

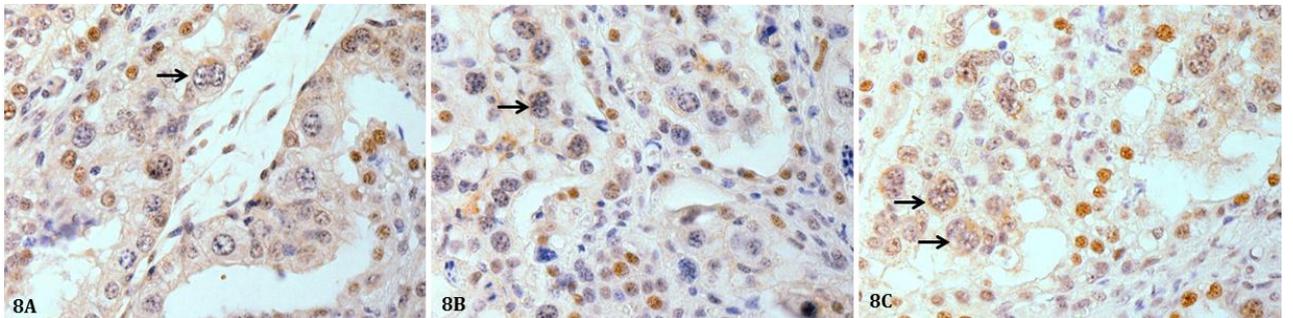


Fig. 8.

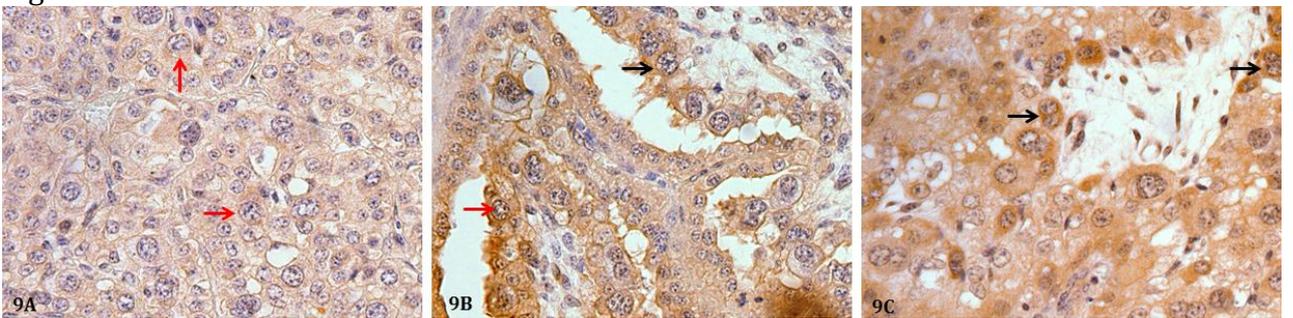


Fig. 9.

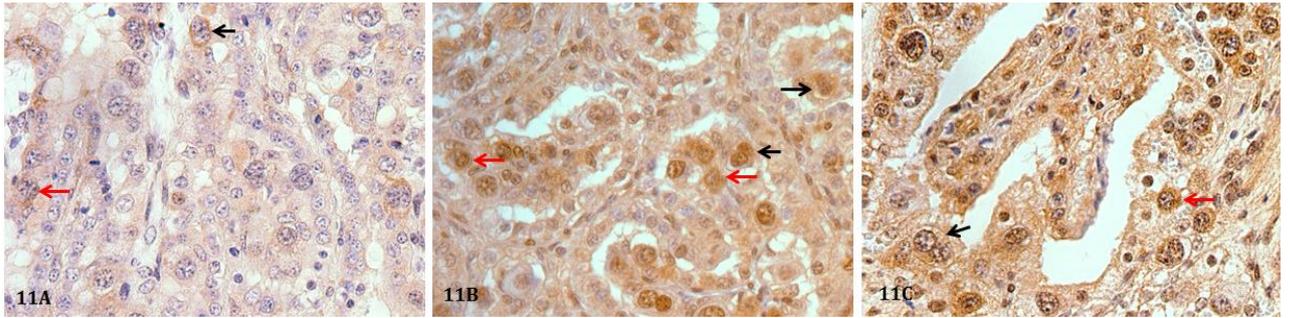


Fig. 11.

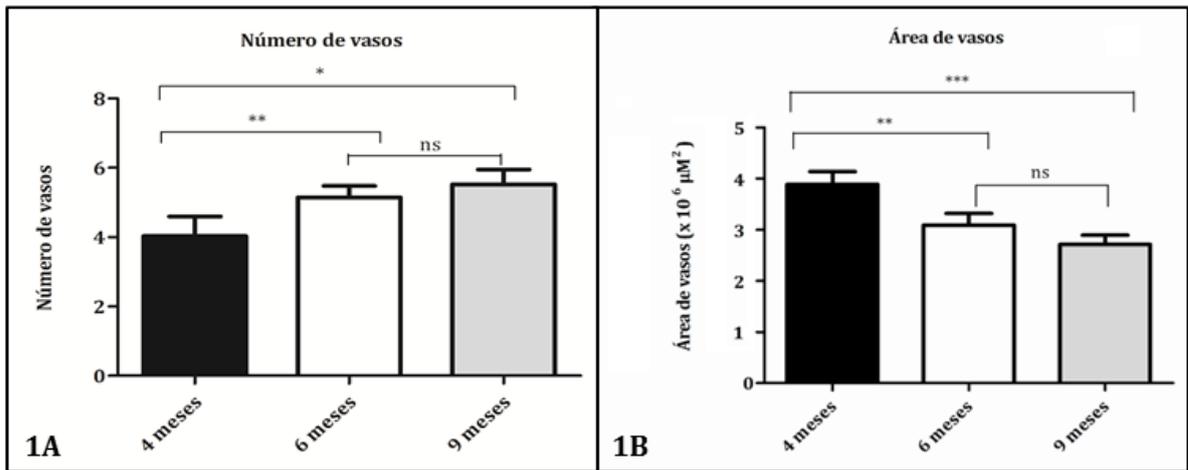


Fig. 1.

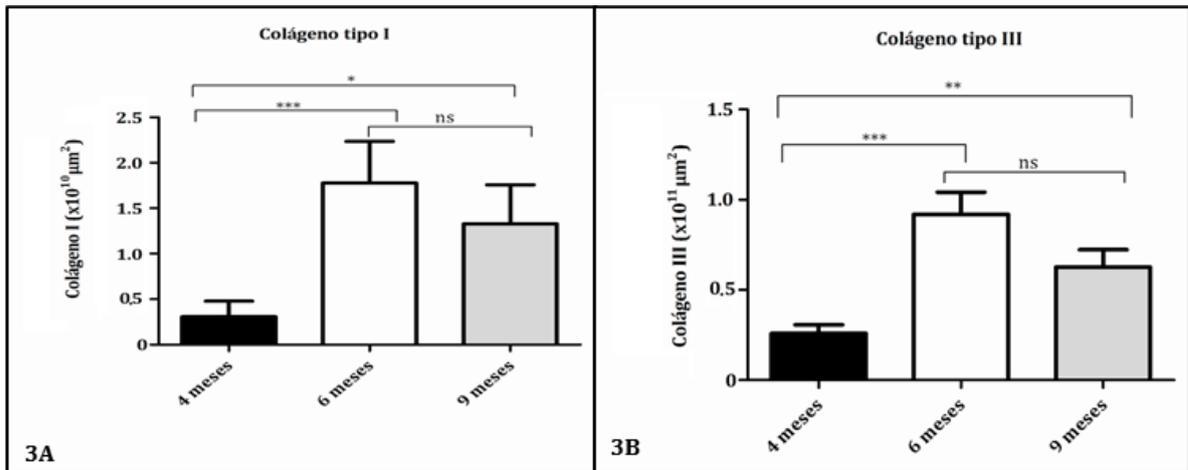


Fig. 3.

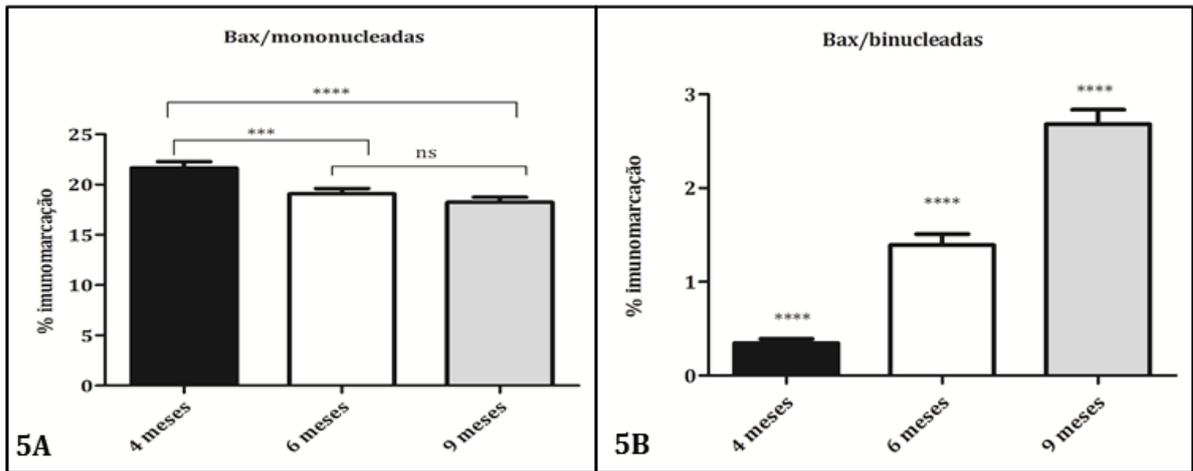


Fig. 5.

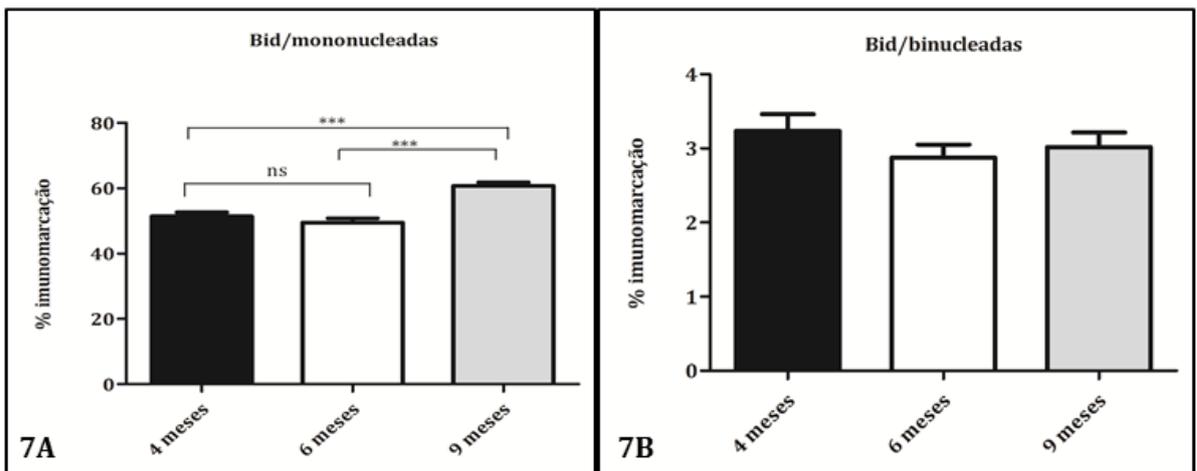


Fig. 7.

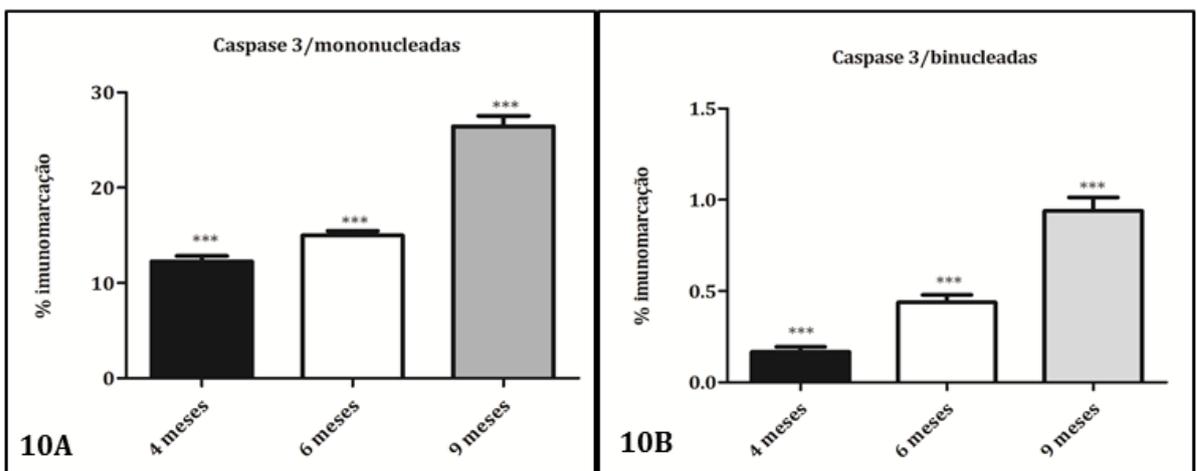


Fig. 10.

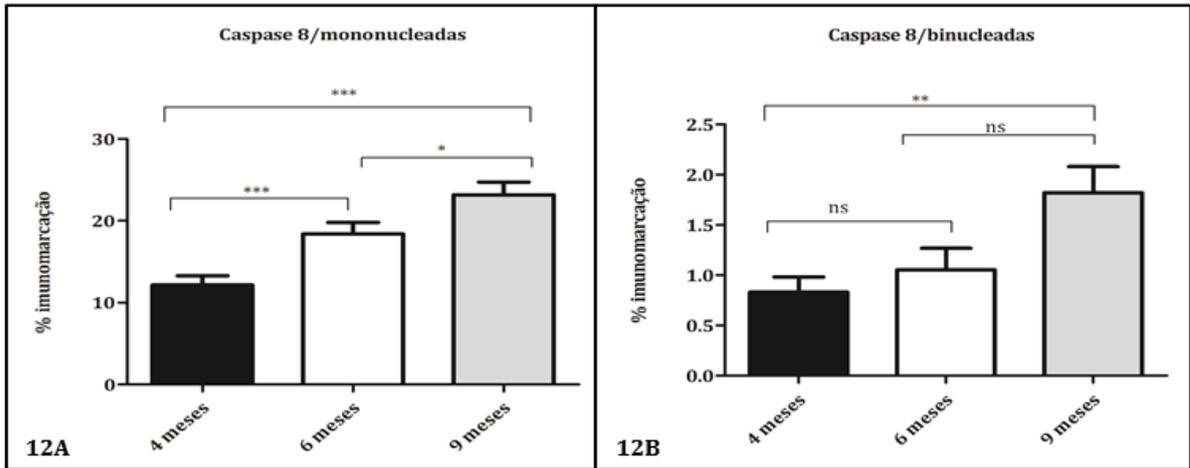


Fig. 12.

CAPITULO 3

OUTRAS ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Avaliação microscópica

Ao exame microscópico, não se detectou reações vasculares e/ou focos de inflamação e necrose em nenhum dos campos examinados. Assim, células com núcleos segmentados, quando presentes, apresentavam uma distribuição esparsa com ocorrência individualizada, não condizente com foco ou infiltrado de natureza inflamatória. Em vez disso, tais características se enquadravam melhor dentro do achado de retração celular com condensação e fragmentação nuclear característicos de apoptose.

Índice apoptótico

A apoptose foi reconhecida pelas características morfológicas estando presente em todas as idades gestacionais estudadas (Figura 1). O índice apoptótico foi menor nas amostras do grupo com 4 meses de gestação (14,93%) e aumentou progressivamente aos 6 meses e aos 9 meses de gestação (20,83% e 36,80%) respectivamente (Figura 2) ($p < 0,0001$).

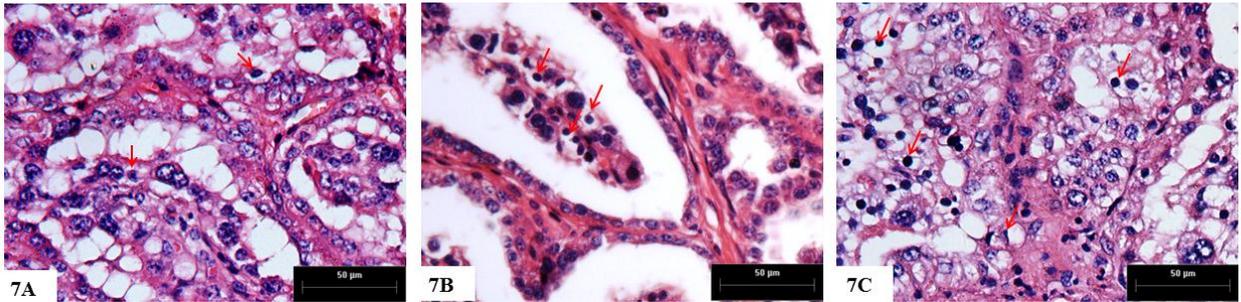


Figura 1: Fotomicrografias de placenta de vaca. (A) representa o grupo com 4 meses de gestação, com menor índice apoptótico. (B) representa o grupo com 6 meses de gestação. (C) representa o grupo com 9 meses de gestação e com maior índice apoptótico. Apoptose caracterizada morfologicamente por retração celular, anoiquia, condensação citoplasmática e nuclear, além de fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (setas). Hematoxilina-Eosina, Barra = 50 µm.

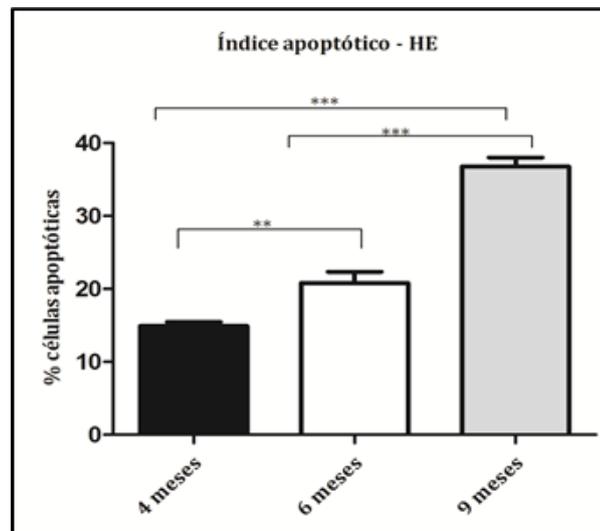


Figura 2: Distribuição do índice apoptótico em placenta bovina nos grupos com 4, 6 e 9 meses de gestação. O índice apoptótico aumentou do grupo com 4 meses ($14,93 \pm 0,539$) para o de 6 ($20,83 \pm 1,509$) e para 9 meses de gestação ($36,80 \pm 1,212$), com $p < 0,0001$.

Dissociação das fibras do estroma

A dissociação das fibras do estroma das vilosidades coriônicas mostrou ocorrência similar entre placentas com 4 e 6 meses, e diminuiu aos 9 meses de gestação, com $p < 0,001$ (Figura 3).

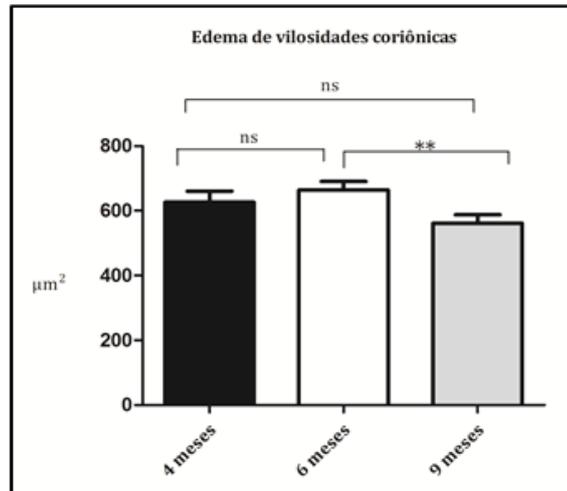


Figura 3: Análise morfológica da dissociação das fibras do estroma de vilosidades coriônicas em placentas bovinas com 4, 6 e 9 meses de gestação. A dissociação das fibras foi similar aos 4 ($626,3 \pm 34,09$) e 6 meses ($664,4 \pm 25,74$), e diminuiu aos 9 meses de gestação ($561,7 \pm 26,13$), com $p < 0,001$.

Reação de imunoistoquímica para bcl-2

A reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal para a proteína Bcl-2 ocorreu como grumos castanhos no citoplasma das células trofoblásticas no tecido materno e com maior intensidade no tecido fetal. Porém, esta reação com o anticorpo Bcl-2 ocorreu somente em uma amostra. Apesar de terem sido repetidas inúmeras vezes seguindo o mesmo protocolo e tentando-se modificações, não se obteve sucesso para os outros animais. Assim, com uma única amostra do grupo de 9 meses de gestação, calculou-se o número mínimo de campos e o índice de marcação para Bcl-2, que foi de 13,04% ($\pm 0,52$) em células trofoblásticas mononucleadas e 1,5% ($\pm 0,11$) em células trofoblásticas binucleadas (Figura 4).

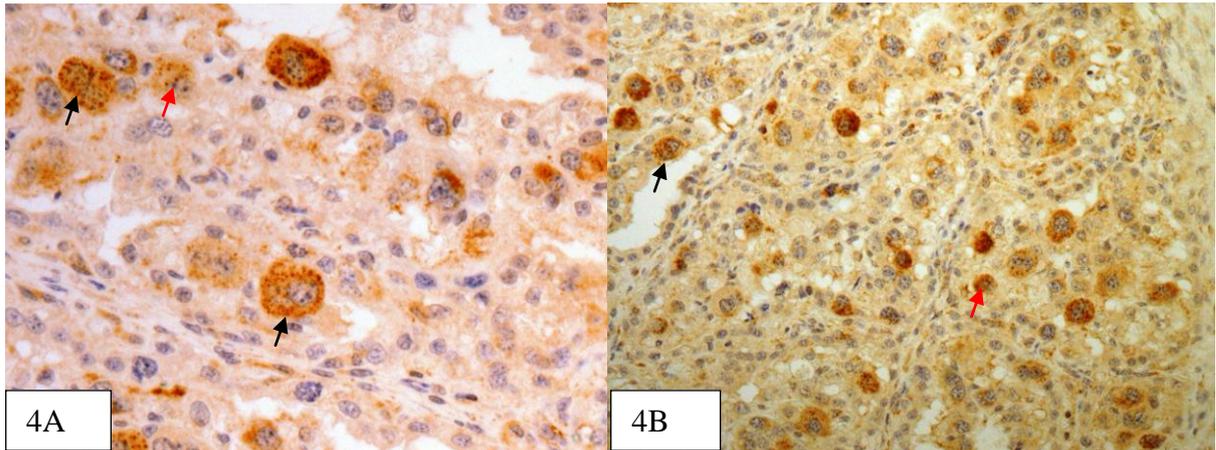


Figura 4 - Placenta de vaca mostrando marcação imunoistoquímica para Bcl-2 em células trofoblásticas mononucleadas e binucleadas. Áreas acastanhadas no citoplasma e núcleo definem marcações imunorreativas (seta vermelha: célula mononucleada e epitélio materno; seta preta: células binucleadas). (A e B) Placenta com 9 meses de gestação. Complexo estreptavidina-peroxidase. (A) 40x. (B) 20x.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho avaliou-se o índice apoptótico, a dissociação das fibras do estroma das vilosidades coriônicas em placentas bovinas de 4, 6 e 9 meses de gestação, além da marcação imunohistoquímica para Bcl-2 em células trofoblásticas mononucleadas e binucleadas de uma amostra aos 9 meses de idade.

O índice apoptótico foi menor aos 4 meses e aumentou progressivamente aos 6 e 9 meses de gestação. Tal resultado reforça e confirma os resultados obtidos apresentados no capítulo 2, enfocando os marcadores pró apoptose (aumento das imunomarcações para Caspases 3 e 8, e Bid com o avanço gestacional), que também apresentaram tal comportamento.

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 ocorreu durante toda gestação, como é relatado por Boss et al. (2003), refletindo a renovação normal e, mais ao final da gestação, a maturação placentária e a preparação para o parto. Smith et al. (1997) relacionam a apoptose com a remodelação placentária, que auxilia na manutenção adequada das proporções teciduais.

O índice apoptótico aumentou aos 9 meses de gestação concordando com Levy e Nelson (2000) e com Straszewski-Chavez et al. (2004), que relatam a maior incidência de apoptose no último trimestre de gestação. Williams et al. (1987) relataram a diminuição progressiva de células trofoblásticas gigantes na vaca ao longo da gestação. O número de células binucleadas diminuiu somente nas últimas semanas da gestação (Wooding et al. 1993). Quando o número das células binucleadas não diminuiu no final da gestação aumenta-se as chances de retenção placentária (Santos et al. 1996).

A dissociação das fibras do estroma das vilosidades coriônicas diminuiu dos 6 para os 9 meses de gestação e pode estar relacionada com o aumento de estrógenos. Placentomas podem apresentar infiltração hídrica e intumescência do tecido conjuntivo atribuídas aos estrogênios. É possível que nesta fase final da maturação dos placentomas possa ter ocorrido alguma queda na secreção de estradiol. Assim, em nosso estudo, no terço final da gestação foi

observado diminuição da dissociação das fibras do estroma das vilosidades coriônicas, o que esta de acordo com o estudo de Grunert e Birgel (1989) que concluíram que a maior dissociação das fibras pode ocorrer devido a edema de vilosidades coriônicas nas placentas com retenção.

A expressão de Bcl-2 em células trofoblásticas mononucleadas e binucleadas em placenta de vaca pode ser um mecanismo fundamental pelo qual estes componentes epiteliais são preservados (LEA et al., 1997). Curiosamente, em alguns outros órgãos e tecidos, a expressão de Bcl-2 é restrita a células progenitoras de longa vida (De FRANCO, 1992).

CONCLUSÃO

A apoptose foi observada morfológicamente em placentas de bovinos durante todo período gestacional, sendo mais significativa no último trimestre gestacional. Isto reforça a importância da apoptose no processo de maturação placentária, juntamente com a diminuição da dissociação das fibras das vilosidades coriônicas, que diminuem a adesão dos tecidos materno-fetal. A proteína Bcl-2 foi expressa em células trofoblásticas mononucleadas e com maior intensidade de coloração em células trofoblásticas binucleadas, porém não foi possível realizar a quantificação desta proteína em todos os períodos gestacionais estudados.

REFERÊNCIAS

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, n. 4, p. 469–480, 2003.

De FRANCO, A.L. Bcl-2 to the rescue. **Immune Dev.**, v.2, p. 95-97, 1992.

GRUNERT, E., BIRGEL, E.H. **Obstetrícia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 323p., 1989.

LEA, R.G.; AL-SHAREKH, N.; TULPPALA, M. et al. The immunolocalization of bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies. **Human Reproduction**, v. 12, p. 153-158, 1997.

LEVY, R.; NELSON, D.M. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. **Placenta**, v.21, n.1, p.1-13, 2000.

MARTINS, V.M.V., MARQUES JUNIOR, A.P., VASCONCELOS, A.C., MARTINS, E., SANTOS, R.L. & LIMA, F.P.C. Maturação e expulsão placentária em vacas das raças Holandesa e Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p. 157-167, 2004.

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

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S.L., ABRAHAMS, V.M., FUNAI, E.F. & MOR, G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p. 33-41, 2004.

RES: Submissão de artigo, Trabalho 3667 MF



Jurgen Dobereiner (jurgen.dobereiner@pvb.com.br) [Adicionar aos contatos](#) 07/03/2014 ▶
Para: 'Tati Carvalho' ✕

Prezada Dra. Tatiane,

O seu artigo foi registrado como **Trabalho 3667 MF**.

Atenciosamente,

Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.