

APOPTOSE E A EXPRESSÃO DE BCL-2, DAS CASPASES 3 E 8 EM PLACENTA BOVINA COM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS

MEÇA, K.K.O.L.¹; MARTINS, A.S.²; DEL PUERTO, H.L.²; VASCONCELOS, A.C.¹; VERÇOSA, B. L. A.^{1*}

INTRODUÇÃO

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular ativa que requer energia, síntese (Kerr et al., 1972) e degradação protéicas. Trata-se de um mecanismo fisiológico de controle celular que regula o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (Vasconcelos, 1995). A apoptose é induzida pela ativação de um programa intrínseco da célula.

Durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta, muitas células morrem por apoptose (Raff, 1992), que pode ocorrer em condições fisiológicas e patológicas (Kerr et al., 1972). Fisiologicamente, a apoptose possibilita a eliminação de células não necessárias para a manutenção da homeostase (Wöhrl e Häcker, 1999). A sua ocorrência possibilita um controle altamente regulado da celularidade com eliminação de células indesejáveis e conseqüente diminuição da celularidade tecidual (Hengartner, 2000). Tanto a proliferação celular quanto a apoptose desempenha 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.

Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo ativo, controlado geneticamente, dependente de energia, síntese de mRNA e de expressão e degradação de proteínas específicas (Kerr et al., 1972; Martin et al., 1988; Horvitz, 1990; Oppenheim et al., 1990; Arends e Wyllie, 1991; Ellis e Horvitz, 1991; Raff, 1992; Kerr, 1993; Kamiya, 1997). A família das proteínas bcl-2, que desempenha papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas. Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Algumas dessas proteínas, como bcl-2 e bcl-XL, bcl-w, mcl-1 e A1 são antiapoptóticas, enquanto outras, tais como a bax, bad e bid são próapoptóticas (Thompson, 1999). A maioria das mudanças que ocorrem são mediadas por uma cascata enzimática envolvendo cisteíno-proteases, chamadas caspases, que clivam resíduos de ácido aspártico (Hengartner, 2000). Atualmente, já foram identificadas 14 caspases (Abbas et al., 2000) que podem ser classificadas em iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e executoras (3, 6 e 7) (Amarante-Mendes e Green, 1999).

Os objetivos do trabalho foram desenvolver iniciadores específicos de oligonucleotídeos para transcrição reversa e amplificação de regiões-alvo dos mRNAs das caspases 3 e 8 e de bcl-2 de vacas e otimizar um protocolo de RT-PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão desses genes em placenta de

¹Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais; e-mail: brbaravet@yahoo.com.br, anilton@icb.ufmg.br

²Departamento de Fisiologia – ICB – UFMG - Belo Horizonte, MG

vacas em diferentes idades gestacionais e comparar com o índice apoptótico através da morfometria em hematoxilina-eosina e pelo método TUNEL.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas placentas de vacas mestiças (n = 15) provenientes do Frigorífico Alvorada, situado no município de Igarapé em Minas Gerais. Essas amostras foram divididas em três grupos: Grupo 1: placentomas de 5 vacas com idade gestacional de quatro meses; Grupo 2: placentomas de 5 vacas com idade gestacional de seis meses; Grupo 3: placentomas de 5 vacas com idade gestacional de nove meses. A estimativa da idade fetal foi calculada pelo comprimento crânio-caudal (CRL) do feto (Noaves, 1990). Amostras dos placentomas foram coletadas para processamento histológico e para extração de RNA. Lâminas com secções de 5µm foram coradas em HE para determinação do índice apoptótico e preparadas para a reação de TUNEL, que marca *in situ* as extremidades 3'-OH do DNA fragmentado no processo de apoptose. Na quantificação do IA, foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentaram pelo menos três características morfológicas (Vasconcelos, 2001).

Para a extração de RNA total, foi utilizada a técnica descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Após verificação da integridade do RNA das amostras através de eletroforese em gel de agarose as suas concentrações foram determinadas pela leitura da densidade óptica (OD) em comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro *GeneQuant*. Os oligonucleotídeos iniciadores ou primers foram selecionados com base na análise de homologia entre as seqüências dos mRNAs codificadores das caspases 3 e 8, do bcl-2 e s26 obteve-se as regiões-alvos para PCR descritas no GeneBank, obtidas por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Para a realização da transcrição reversa (RT) segundo protocolo previamente descrito por Martins et al. (1995). Para verificação da eficiência e especificidade dos *primers* para caspases 3 e 8, bcl-2 e s26 selecionados para PCR em Tempo Real, utilizou-se a PCR convencional (Saiki et al, 1985) com algumas modificações. A reação foi desenvolvida em termociclador *MJ Research Minicycler*. Com o objetivo de se obter um fragmento de PCR puro e específico para quantificação e utilização como padrão no PCR em Tempo Real foi feita a purificação dos amplicons alvos de bcl-2, caspase 3, caspase 8 e s26 através de gel-purificação por eletroeluição.

Para a reação de PCR em Tempo Real foi utilizado o kit SYBR GREEN PCR core Reagents da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, uma curva-padrão de todos os amplicons purificados, foi construída a partir de diluições seriais. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em Tempo Real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no ABI Prism 7000 SDS.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, sendo os dados paramétricos e com distribuição normal analisados pela análise de variância para grupos independentes, adotando-se $P < 0,05$. Para análise da variação entre os grupos, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls, adotando-se $P < 0,001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coloração pela HE mostrou-se eficiente para a caracterização morfológica da apoptose, conforme os critérios de inclusão. A apoptose foi facilmente reconhecida em todos os campos microscópicos de todas as amostras processadas. O índice apoptótico do grupo com nove meses de gestação foi maior ($48,5 \pm 3,08$) que o do grupo com seis meses ($34,78 \pm 3,97$), que por sua vez foi maior que o do grupo quatro meses de gestação ($15,01 \pm 2,11$), com $P < 0,0001$. Demonstrando o aumento do índice apoptótico com o avanço da idade gestacional. A análise de variância mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A morte celular, por apoptose se desenvolveu na ausência de inflamação, que é característico da apoptose (Gerschenson e Rotello, 1992).

Apoptose ocorre na placenta em toda a gestação, mas com uma maior frequência no período final, em comparação com o primeiro trimestre. (Straszewski-Chavez et al., 2004). A sua ocorrência aumenta consideravelmente no terço final da gestação (Boos et al., 2003; Smith et al., 1997). Nesse caso, a apoptose parece estar relacionada com o mecanismo de remodelação placentária auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais (Smith et al., 1997).

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

A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para a maturação, quanto para a liberação normal da placenta após o parto (Martins, E., 1999; Martins et al., 2004; Martins, V. M. V., 1999; Nunes et al., 2001;).

A apoptose foi também demonstrada através da técnica de TUNEL (figura 1), confirmando o achado da morfometria em hemotoxilina-eosina. Essa técnica permite a confirmação da presença da apoptose através da marcação da fragmentação internucleossômica do DNA (Gavrieli et al., 1992; Migheli et al., 1995; Mundle & Raza, 1995; Sanders & Wride, 1996). Quase todas as células marcadas exibiam morfologia característica da apoptose. Poucas células com morfologia característica da apoptose não estavam marcadas e isso pode ser explicada pela presença de ligações protéicas cruzadas durante o processo de fixação tecidual que é um dos mecanismos responsáveis pela baixa sensibilidade do TUNEL (Gold et al., 1994; Labat-Moleur et al. (1998). Negoescu et al. (1996) e Labat-Moleur et al. (1998) sugerem que a sensibilidade do TUNEL pode ser avaliada através da comparação com os resultados obtidos em microscopia óptica. Para Kerr et al. (1972), a presença da morfologia padrão de apoptose, envolvendo a condensação da cromatina e a fragmentação citoplasmática em corpos apoptóticos, seria suficiente para identificação histológica da apoptose.

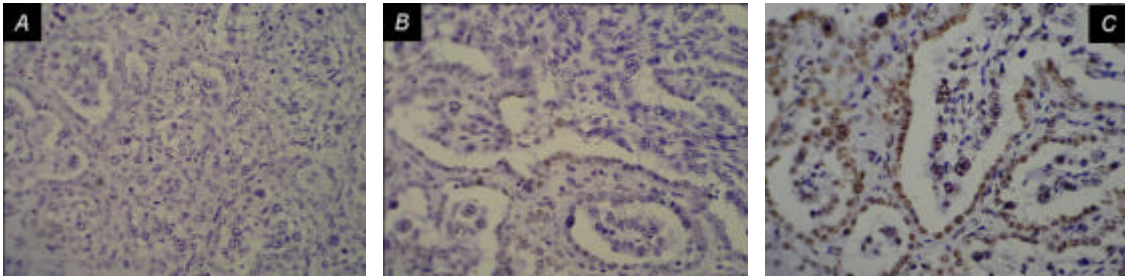


Figura 1. Fotomicrografia de placenta de vaca mostrando marcações de células em apoptose. (A) Placenta de quatro meses de gestação com poucas marcações de células em apoptose. (B) Placenta de seis meses de gestação com número moderado de marcações de células em apoptose. (C) Placenta de nove meses de gestação com um grande número de marcações de células em apoptose. Evidenciando um aumento do espaço materno- fetal com o avanço da gestação. (TUNEL, 40X).

Os resultados da quantificação de RNA total foram obtidos por espectrofotometria. A quantidade total de RNA por amostra variou de 1,7 a 10,4 μg , como esperado segundo Chomczynski e Sacchi (1987).

Os oligonucleotídeos designados para RT-PCR do *bcl-2*, das caspases 8 e 3, s26 foram, *bcl-2*: BCL2-F= 5'-CTTCCTGGCTGTGGCGACCCAGAT-3' e BCL2-R= 5'-CCACGGAGTACAGGGACACA ACTTT-3', amplicon é de 74 pb; caspase 8: CASP8-F= 5'-ACAAGGGCATCATCTATGGCTCCGA-3' e CASP8-R= 5'CCAGTGAAGT AAGAGGTCAG CTCAT-3', amplicon de 70 pb; caspase 3: CASP3-F = 5'-TTCATTA TTCAGGCCTGCCGAGG -3' e CASP3-R= 5'-TTCTGACAGGCCATG TCATCCTCA -3', amplicon de 86 pb. Para normalização das concentrações de mRNA expresso nos tecidos analisados por PCR em Tempo Real utilizou-se o par de *primers* para o S26: S26BT-F=5'-CTTCCCAAGCTGTATGTGAAACTAC-3'; s26BT-R= 5'-CGATTCCGA CTACCTTGCTGTGA, amplicon é de 75 pb. Os primers foram criteriosamente selecionados para a RT PCR em tempo real levando-se em consideração regiões com conteúdo satisfatório de GC, o número de nucleotídeos e com *Tm* permitido. As seqüências escolhidas para confecção dos oligonucleotídeos iniciadores foram pesquisadas no Blastn para garantir a exclusão de regiões homólogas com os alvos pesquisados. Essa estratégia foi fundamental para o sucesso de amplificação pela PCR convencional, bem como pela PCR em tempo real neste trabalho. A utilização da região de junção para splicing, contendo um intron, na seleção dos primers reduz a possibilidade de influência de possíveis contaminações por DNA genômico das preparações de RNA total durante a amplificação (Ausubel et al., 1995). A contaminação por DNA genômico poderia interferir na etapa de PCR, posterior à transcrição reversa, levando a uma falsa interpretação da expressão do mRNA reverso-transcrito. Portanto, a estratégia utilizada reduz a possibilidade de amplificação inespecífica de DNA genômico e isso permitiu a obtenção de fragmentos puros e específicos para os genes escolhidos.

As curvas-padrão dos resultados do PCR em Tempo Real das amostras de placenta de vacas para *bcl-2*, caspase 3 e 8 mostra que o amplicon de cada um foi amplificado em duplicata a partir do cDNA de tecido placentário apresentou a clássica curva logarítmica, contendo curvas de amplificação refletindo diferentes quantidades iniciais de cDNA, variando de 1ng a 1x10-6ng.

Estes dados demonstram que a expressão de cada amostra pode ser quantificável. Além disso, os resultados das curvas de dissociação para *bcl-2*, caspase 3 e 8 são apresentados na Figura 2, respectivamente, confirmando a pureza, qualidade, tamanho e especificidade dos fragmentos amplificados pelo PCR em Tempo Real. As curvas foram realizadas como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* para todos os fragmentos.

O amplicon para *bcl-2*, caspase 3 e 8 obtido após eletroeluição do fragmento de PCR convencional, foi utilizado para a construção das curvas apresentadas. Os resultados das curvas de calibração para *bcl-2*, caspase 3 e 8 demonstram uma boa qualidade de pipetagem, diluição, sensibilidade e reproducibilidade. Os resultados das duplicatas foram altamente fiéis. A eficácia da RTPCR foi 100% obtida pela equação $E=10[-1/\text{slope}]$. A inclinação e a alta linearidade são demonstradas pelo $\text{slope} = -4,244$ e $r^2=0,987$ para *bcl-2*, pelo $\text{slope} = -4,176$ e $r^2=0,983$ para caspase 3 e pelo $\text{slope} = -3,944$ e $r^2= 0,997$ para caspase 8. Pode-se observar nessas figuras que o Ct (total de ciclos) foi perfeitamente mantido, logaritmicamente, com as diluições do padrão de 86 pb para caspase 3, de 74pb para *bcl-2* e de 70pb para caspase 8. Este resultado é fundamental para quantificações absolutas da expressão desses genes em placenta de vaca.

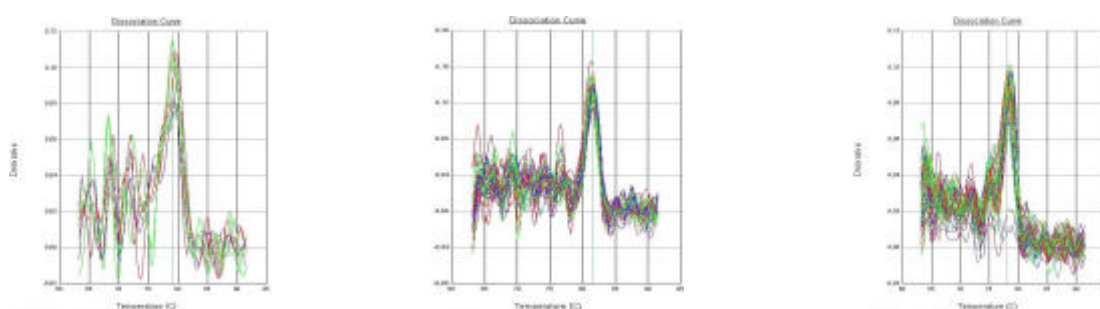


Figura 2. A curva de dissociação demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio, com $T_m = 79,2^\circ\text{C}$ para *bcl-2*, $T_m = 81,5^\circ\text{C}$ para caspase 3 e $T_m = 78,0^\circ\text{C}$ para caspase 8 respectivamente.

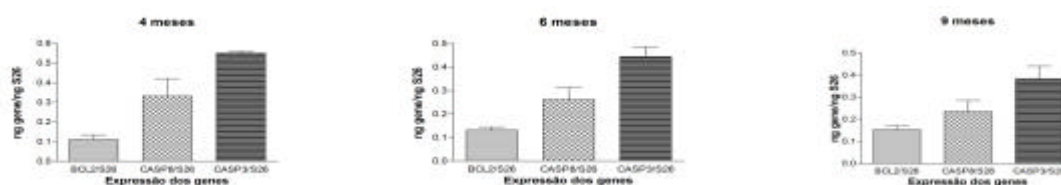


Figura 3. Expressão absoluta do *bcl-2*, das caspases 3 e 8 com 4, 6 e 9 meses, respectivamente. Houve diferenças significativas.

A amplificação do *bcl-2*, caspases 3 e 8 indica que eles participam do processo de apoptose em todas as idades gestacionais estudadas com um mesmo comportamento, sendo a expressão absoluta de *bcl-2* menor que a de caspase 8, que é menor que a de caspase 3 (figura 3). A maior expressão dos dois genes pró-apoptóticos (caspase 3 e 8) mostra uma tendência favorável a apoptose. Segundo

Patel e Gores, 1995, os principais antagonistas da apoptose, bcl-2 e bcl-XL, localizam-se, principalmente, na membrana mitocondrial. Essas proteínas são capazes de formar poros condutores de íons em membranas sintéticas (Thompson, 1999). Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais elas mantêm a homeostasia celular, seja o de regulação da permeabilidade das membranas nas quais se distribuem. Demonstrou-se que a bcl-2 bloqueia a penetração nuclear de perforina e granzime, substâncias liberadas pelos linfócitos T citotóxicos contra seus alvos e que podem ser ativadoras de caspases (Kerr et al., 1972).

Um dos principais passos da via de suicídio celular é a ativação das caspases as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. Porém, a apoptose pode também ocorrer independentemente da ativação de caspases (Donovan e Cotter, 2004). As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico (Thompson, 1999). Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos e estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalizar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase 8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase 3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (Patel e Gores, 1999).

O aumento da apoptose está associado com a ativação do PARP e da ativação da caspase-3 em placenta (Charles et al., 2005). Os maiores níveis expressão, de 12 genes relacionados com a apoptose (caspase 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, BAD, BAX, BID, Fas, e FasL) foram mostrados em vilosidades coriônicas de doentes com RPL (perda de gravidez recorrentes) e que não nas gestações normais. Tomadas em conjunto, é provável que a menor expressão de genes relacionados angiogênese e a excessiva expressão genes relacionada com a apoptose estão associados a RPL (Choi et al., 2003). Liu Z et al (2003), mostraram que a administração de dose elevada de IFN γ aumentou o grau de apoptose em placenta, o balanço entre Bax e Bcl-2, e ativação a caspase-3. Segundo Yu YC et al. (2003), a insulina pode inibir apoptose de células humanas trofoblastos induzida por H₂O₂, através da diminuição da atividade da caspase-3 e do aumento da expressão de Bcl-2.

Bertoja AZ et al. (2005) concluíram que não há qualquer evidência de aumento de apoptose em ratos submetidos a imunológico aborto, apesar dos elevados níveis TNF-alfa. Isto é provavelmente devido a aumento de vias anti-apoptóticas (ou seja, Bcl-2) na interface materno-fetal como uma compensação e / ou mecanismo de proteção. Hu R, Zhou S, Li X. (2006) sugerem que indução da apoptose em citotrofoblastos cultivados em hipóxia no primeiro trimestre reduziu a expressão de bcl-2 e aumentou a de Bax. viram que a expressão da proteína bcl-2 pode ser um dos principais fatores de prevenção precoce morte celular, que é indispensável para a manutenção da gravidez fisiológica (Danihel L et al., 2002). A ausência ou a exacerbação do fenômeno de apoptose podem resultar em conseqüências desastrosas para os tecidos (Miller; Marx, 1998).

Os resultados da PCR em tempo real de placentas em condições fisiológicas demonstraram, que o bcl-2, as caspases 3 e 8 foram expressos nos três meses

estudados, com um mesmo comportamento. A maior expressão dos dois genes pró-apoptóticos (caspase 3 e 8) mostra uma tendência favorável a apoptose. Estes dados indicam que essas enzimas estão envolvidas na via apoptótica ativada no desenvolvimento placentário, participando da maturação placentária e que atuam sempre com um padrão de expressão ao longo da gestação, sendo responsáveis em parte pelo equilíbrio fisiológico da ocorrência da apoptose na placenta bovina. Mostrando que a preservação deste padrão de expressão leva a um equilíbrio fisiológico do tecido e que a sua alteração deste padrão pode desencadear uma disfunção placentária ou até mesmo patologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulator apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1053-1061, 1999.
- ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, v.32, p.223-254, 1991.
- BARRETO FILHO, J.B.; MARQUES JUNIOR, A.P. Histological aspects of the placenta of zebu cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.45, p.385-393, 1993.
- BERTOJA AZ, ZENCLUSSEN ML, WOLLENBERG I, PAESCHKE S, SOLLWEDEL A, GERLOF K, WOICIECHOWSKY C, VOLK HD, ZENCLUSSEN AC. Upregulation of Bcl-2 at the foetal-maternal interface from mice undergoing abortion. *Scand J Immunol.* 2005 Jun;61(6):492-502.
- 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. *Reproduct* 126: 469–480, 2003
- CHARLES AK, HISHEH S, LIU D, RAO RM, WADDELL BJ, DICKINSON JE, RAO AJ, DHARMARAJAN AM. The expression of apoptosis related genes in the first trimester human placenta using a short term in vitro model. *Apoptosis.* 2005 Jan;10(1):135-40.
- CHOI HK, CHOI BC, LEE SH, KIM JW, CHA KY, BAEK KH. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev.* 2003 Sep;66(1):24-31.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.
- DANIHEL L, GOMOLCÁK P, KORBEL M, PRUZINEC J, VOJTASSÁK J, JANÍK P, BABÁL P. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta Histochem.* 2002;104(4):335-8.
- DONOVAN, M., COTTER, T. G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Bioch. Bioph. Acta*, v. 1644, p. 133-147, 2004.
- ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v. 44, p. 817, 1991
- GAVRIELI, Y; SHERMAN, Y; BEN-SASSON, SA Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, v. 119, n. 3, p.493-501, 1992
- GERSCHENSON, LE; ROTELLO, RJ Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J.*, n. 6, p.2450-2455, 1992.

GOLD, R; SCHMIED, M; BREITSCHPF, H et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.*, v. 71, n. 2, p.219-227, 1994.

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

HORVITZ, H. R.. Genetic control of cell death in nematode *C. elegans*. *Cell. Biol. Int. Rep.* v.14, p.17, 1990.

HU R, ZHOU S, LI X. Altered Bcl-2 and Bax expression is associated with cultured first trimester human cytotrophoblasts apoptosis induced by hypoxia. *Life Sci.* 2006 Jun 20;79(4):351-5. Epub 2006 Feb 24

KAMIYA, S.; DOI, O.; NAKAMASU, F.; AKAYAMA, T.; NAKAMURA, T. Contribution of Ubiquitin to glucocorticoid-induced apoptosis in the bursa of Fabricius. *An. Sci. Technol.*, v.68, n.1, p.13-17, 1997.

KERR, J. F. R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M. WATERS, D. Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis. Chur: Harwood, p. 1-18, 1993.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v.26, p.239-257.1972.

LABAT-MOLEUR, F; GUILLERMET, C; LORIMIER, P et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 46, n. 3, p.327-334, 1998.

LIU Z, SUN QH, YANG Y, LIU JM, PENG JP Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta.. *Cytokine.* 2003 Dec 7;24(5):201-9.

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

MARTIN, D. P.; SCHMIDT, R. E.; Di STEFANO, P. S.; LOWRY, O. H.; CARTER, J. G.; HOHNSON, E. M. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell. Biol.*, v,107, n.3, p. 829-844, 1988.

MARTINS, A. S.; GREENE, L. J.; YOHO, L. L.; MILSTED, A. The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. *Gene*, v.161, pp.253-257, 1995.

Martins VMV, Marques Jr AP, Vasconcelos AC, Martins E, Santos RL, Lima FCL Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 56: 157-167, 2004

MIGHELI, A; ATTANASIO, A; SCHIFFER, D Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end-labeling techniques. *J. Pathol.*, v. 176, p.27-35, 1995.

MUNDLE, SD; RAZA, A The two in situ techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. *Lab. Inv.*, v. 72, n. 5, p.611-613, 1995.

NEGOESCU, A; LORRIMIER, P; LABAT-MOLEUR, F et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, v.44, p.959-968, 1996.

NOAKES, E. Fertilidade e Obstetrícia em Bovinos. São Paulo: Livraria Varela, 1990, p.25.

NUNES, J.E.S.; VASCONCELOS, A.C.; MARTINS, E. et al. Maturação e liberação placentária em bovinos e sua relação com apoptose. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p.513-525, 2001

OPPENHEIM, R. W.; PREVETTE, D.; TYTELL, M.; HOMMA, S. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: Evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol.*, v.138, n.1, p.104-113, 1990.

PATEL T., GORES GJ. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg* 1998;4:42-50

RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, v. 356, p. 397-400, 1992.

SAIKI, R. K.; SHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; EHRLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, v.230, pp.1350-1354, 1985.

SANDERS, EJ; WRIDE, MA Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.*, v.28, p.275-281, 1996.

SANTOS RL, MARQUES JR AP. Histoquantitative studies of the placentomas of milking cows with placental release and retention. *Vet Noticias* 4: 39-42, 1998

SANTOS RL, MARQUES JR AP, BARRETO FILHO JB. Morphometric analysis of collagen in placentomas of dairy cows with normal delivery and with placental retention. *Braz J Vet Res Animal Sci* 34: 240-242, 1997

SMITH SC, BAKER PN, SYMONDS EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstetr Gynecol* 177: 57-65, 1997

STRASZEWSKI-CHAVEZ SL, ABRAHAMS VM, FUNAI EF, MOR G. (2004) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10:33-41

THOMPSON CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p.813-29.

VASCONCELOS, A.C. *Métodos aplicados ao estudo da Apoptose*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 2001. 17p.

VASCONCELOS, A.C.; LAM, K.M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, v.112, p.327-338, 1995.

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

YU YC, XIN XY, ZHANG F, MA XD, WANG DT, GUO HL. [Effect of insulin on apoptosis of cultured human trophoblast cells and its mechanism][Article in Chinese] *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2003 Sep;19(5):496-8.

.