

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

Recebido em 19 de novembro de 2009

Aceito em 6 de abril de 2010

E-mail: karinameca@yahoo.com.br

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

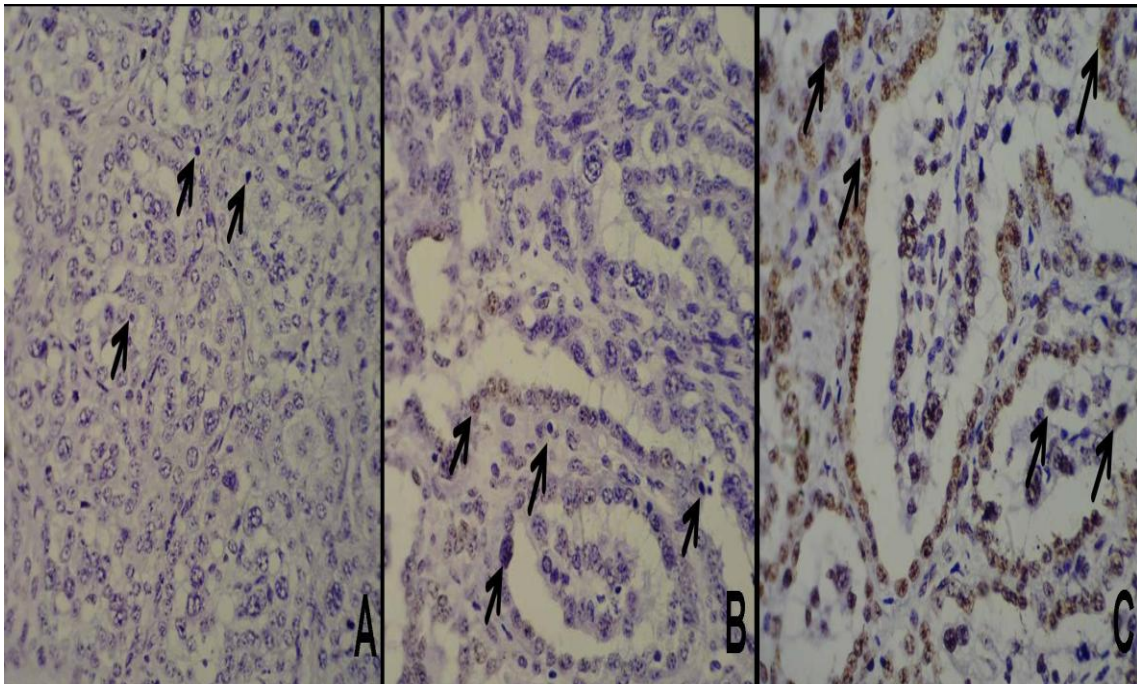


Figura 1. Placenta de vaca mostrando células em apoptose (setas). (A) Placenta com quatro meses de gestação. (B) Placenta com seis meses de gestação. (C) Placenta com nove meses de gestação. (TUNEL, Barra = 10µm).

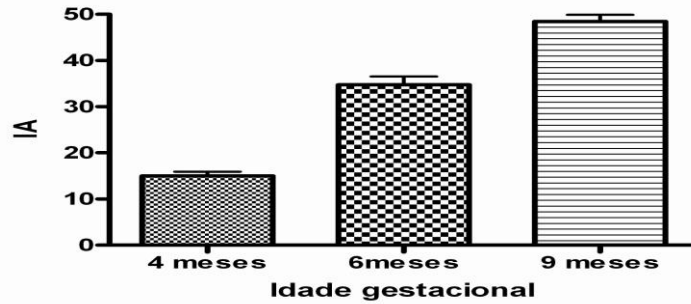


Figura 2. Crescimento progressivo do índice apoptótico com o avanço da gestação. Houve diferença significativa entre os meses.

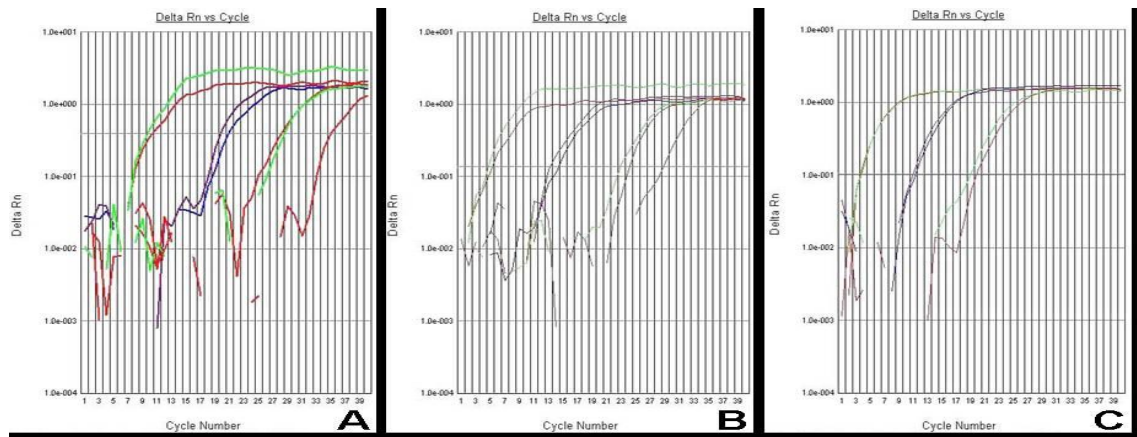


Figura 3. Quantificação da expressão dos genes pela PCR em tempo real, curva de calibração com curvas de amplificação refletindo diferentes quantidades iniciais de cDNA para Bcl-2 (A), caspase 3 (B) e caspase 8 (C), e variação de 1ng a 1x10⁻⁹ng.

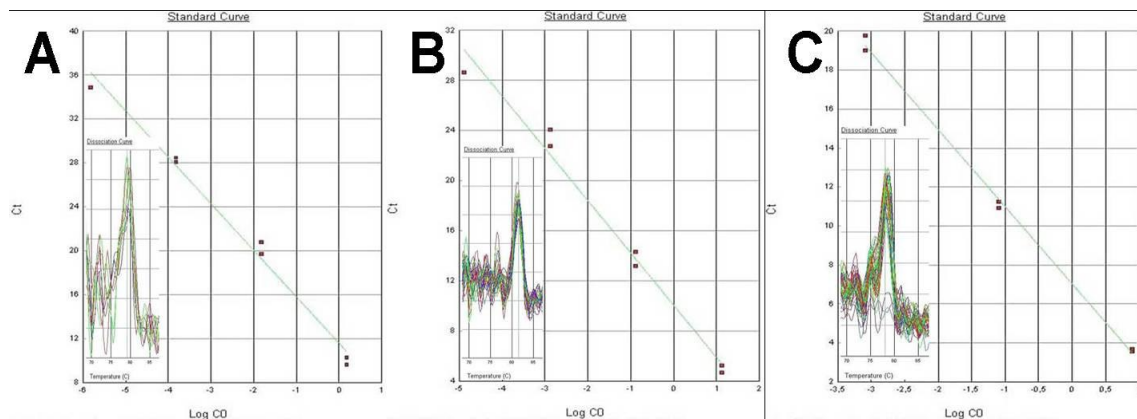


Figura 4. Eficácia da RTPCR do Bcl-2 (A) e das caspases 3 (B) e 8(C): valor de 100%, obtida pela equação $E=10^{-1/\text{slope}}$. (A) A inclinação e a alta linearidade são demonstradas pelo slope e R^2 . As curvas de dissociação apresentadas no detalhe abaixo e à esquerda demonstram as temperaturas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

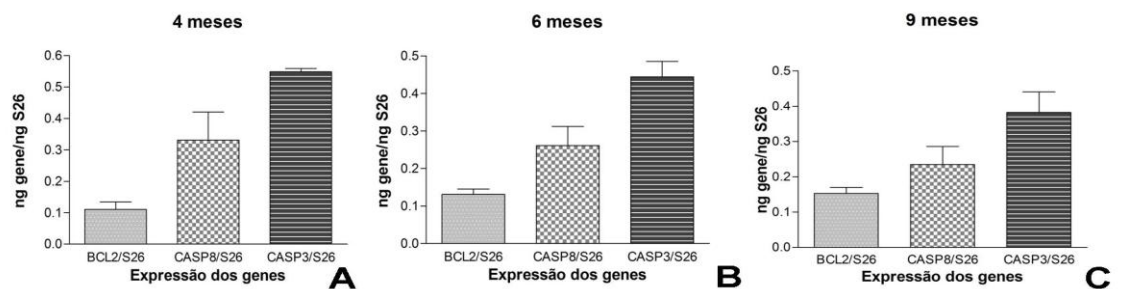


Figura 5. Expressão absoluta do Bcl-2 e das caspases 3 e 8, com 4, 6 e 9 meses de gestação de vacas. Houve diferenças significativas.

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

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

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

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

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

CONCLUSÕES

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

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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