

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES  
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para Artigo de Atualização - **Apoptose: mecanismo fisiológico de morte celular na placenta normal e patológica**, Artigo Original I - **Métodos de detecção *in situ* de proliferação celular e apoptose na placenta de ratas com diabetes grave**, Artigo Original II - **Evolução dos índices de proliferação celular e apoptose em placentas de ratas com diabetes grave: relação com a glicemia materna e o resultado perinatal**, enviados pelo autor no arquivo original.

**Elaine Cristina Nunes Fagundes Costa**

**Evolução dos índices de proliferação celular  
e apoptose em placentas de ratas com diabetes  
grave: relação com a glicemia materna  
e o resultado perinatal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, área de concentração Obstetrícia, para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Prof. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan**

Botucatu – SP  
2002

**Elaine Cristina Nunes Fagundes Costa**

**Evolução dos índices de proliferação celular  
e apoptose em placentas de ratas com diabetes  
grave: relação com a glicemia materna  
e o resultado perinatal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, área de concentração Obstetrícia, para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Prof. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan**

Botucatu – SP  
2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Costa, Elaine Cristina Nunes Fagundes.

Evolução dos índices de proliferação celular e apoptose em placentas de ratas com diabete grave : relação com a glicemia materna e o resultado perinatal / Elaine Cristina Nunes Fagundes Costa . – 2002.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Orientadora: Marilza Vieira Cunha Rudge

Co-orientador: Luís Fernando Barbisan

Assunto CAPES: 40101150

1. Diabetes na gravidez - Fisiopatologia - Estudos experimentais
2. Apoptose - Estudos experimentais

CDD 618.3

Palavras-chave: Placenta; Diabete; Apoptose; Proliferação celular; Ratas

# ***Dedicatória***

**A Deus,**

Por iluminar o meu caminho.

Ao meu esposo **Alexandre,**

Pelo carinho, dedicação e por sempre estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus filhos **Mayara e Alexandre,**

Pelas vezes que não pude me dedicar por falta de tempo.

Aos meus pais **Nelson e Terezinha,**

Pelo apoio e estímulo na minha carreira.

**À Professora Titular Marilza Vieira Cunha Rudge,**

Por sua orientação, exemplo profissional, pessoal e fundamental contribuição para a minha evolução como pesquisadora.

**Ao Professor Doutor Luís Fernando Barbisan,**

Pelos ensinamentos e dedicação, dispensados na realização deste trabalho.

**À Professora Doutora Iracema de Mattos Paranhos Calderon,**

Pela amizade e por me estimular a realizar o Curso de Doutorado.

## ***Agradecimentos***

À Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela oportunidade da realização do curso.

Aos professores do curso de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao técnico Jarbas do Amaral, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pela amizade e por sua dedicação e habilidade que muito contribuíram para a qualidade deste experimento.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, em especial à Sueli e à Cristina.

À Professora Doutora Maria Aparecida Mourão Brasil, pela amizade, dedicação e análise estatística dos dados.

À funcionária Patrícia Guarnieri Frazão, da Diretoria da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela amizade, carinho e dedicação.

Aos funcionários Aparecida Vasques, Cristiane Abe e Renato Antunes Ribeiro do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela ajuda e dedicação.

Aos funcionários Vera Lúcia Aparecida Mengue, Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela dedicação durante o período do curso.

Aos amigos de Pós-graduação Fernanda Guassú de Almeida e Gustavo Tadeu Volpato, pela contribuição neste trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

---

|                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Artigo de Atualização                                                                                                                                          |     |
| Apoptose: mecanismo fisiológico de morte celular na placenta normal e patológica .....                                                                         | 01  |
| Introdução .....                                                                                                                                               | 02  |
| Características morfológicas e bioquímicas da apoptose .....                                                                                                   | 04  |
| Indutores e inibidores da apoptose .....                                                                                                                       | 07  |
| Apoptose no sistema reprodutor feminino .....                                                                                                                  | 10  |
| Apoptose na placenta .....                                                                                                                                     | 11  |
| Leituras Suplementares .....                                                                                                                                   | 15  |
| Artigo Original I                                                                                                                                              |     |
| Métodos de detecção <i>in situ</i> de proliferação celular e apoptose na placenta de ratas com diabetes grave .....                                            | 17  |
| Resumo .....                                                                                                                                                   | 18  |
| Summary .....                                                                                                                                                  | 19  |
| Introdução .....                                                                                                                                               | 20  |
| Material e métodos .....                                                                                                                                       | 23  |
| Resultados .....                                                                                                                                               | 38  |
| Discussão .....                                                                                                                                                | 45  |
| Referências .....                                                                                                                                              | 52  |
| Artigo Original II                                                                                                                                             |     |
| Evolução dos índices de proliferação celular e apoptose em placentas de ratas com diabetes grave: relação com a glicemia materna e o resultado perinatal ..... | 61  |
| Resumo .....                                                                                                                                                   | 62  |
| Summary .....                                                                                                                                                  | 63  |
| Introdução .....                                                                                                                                               | 64  |
| Material e métodos .....                                                                                                                                       | 69  |
| Resultados .....                                                                                                                                               | 81  |
| Discussão .....                                                                                                                                                | 89  |
| Referências .....                                                                                                                                              | 95  |
| Anexos .....                                                                                                                                                   | 100 |

---

## **Artigo de Atualização\***

# **Apoptose: mecanismo fisiológico de morte celular na placenta normal e patológica**

---

\* Padronizado de acordo com as normas para publicação na Femina

## *Introdução*

A morte celular programada ou apoptose é parte intrínseca do desenvolvimento de tecidos e órgãos sendo descrita também no feto e na placenta. Considera-se, na atualidade, que a apoptose tem papel crítico nos diferentes estágios de desenvolvimento placentário, incluindo a invasão intersticial e endovascular e a tolerância imunológica materna (Crocker et al., 2001).

Duke et al. (1996) relataram que a manutenção dos organismos vivos depende do balanço equilibrado entre a habilidade de produzir novas células e a capacidade de eliminar células individuais desnecessárias, danificadas ou prejudiciais. Muitas células de um organismo vivo morrem para que o conjunto sobreviva. Assim, como é preciso gerar novas células para manter processos vitais, é imprescindível eliminar as supérfluas ou defeituosas. Estudos recentes revelam que muitas células carregam instruções internas (programa genético) para cometer suicídio no momento em que não são mais úteis ao organismo. Tais instruções são executadas quando certos comandos internos são acionados (Horta & Young, 1999).

Apoptose é um termo descritivo para a morfologia única de suicídio celular. As alterações morfológicas seqüenciais da apoptose foram descritas, em detalhes, pela primeira vez por Kerr et al. (1972). A palavra apoptose vem do grego e significa: apo = de e ptosis = cair, termo clássico que lembra a queda das folhas no outono ou a queda das pétalas de flores. A apoptose é uma forma fisiológica de morte celular que, juntamente com a mitose, controla

o número de células num tecido vivo; ela ocorre em inúmeros processos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos.

As pesquisas envolvendo a morte celular programada ou apoptose têm crescido nos últimos anos, nas áreas básicas e nas aplicadas. É conhecida desde 1885 e descrita originalmente em folículos ovarianos. Acreditava-se que era prejudicial ao organismo, mas hoje, ao contrário, sabe-se que os seres pluricelulares só atingem sua forma final porque eliminam, de modo seletivo, certo tipo de células. Isto significa que a homeostasia é controlada não somente pela proliferação e diferenciação celular, mas também pela morte das células. A apoptose pode ser observada na metamorfose de anfíbios e insetos, bem como no desenvolvimento embrionário e fetal dos organismos vivos (Majno & Joris, 1995). Nos seres humanos, os exemplos mais característicos de apoptose são a involução mülleriana e dos ductos de Wolff, a perda dos septos interdigitais da mão, a formação de vísceras ocas, como o coração, e a involução e atrofia de tecidos hormônio-dependentes, como a mama na fase de pós-lactação. A formação da mão humana segue processo semelhante pois, no início, é um apêndice arredondado, sem dedos definidos. Os dedos são formados pela multiplicação de algumas células, enquanto as que estão no espaço entre eles recebem o comando para morrer por apoptose. Se isso não ocorresse os dedos das mãos seriam ligados por uma membrana, como os pés de patos (Horta & Young, 1999).

### *Características morfológicas e bioquímicas da apoptose*

A morte ocasional das células é um processo fisiológico normal, totalmente regulado, com características morfológicas e bioquímicas específicas (Wyllie et al., 1980).

A apoptose é processo dependente de regulação genética, no qual há eliminação das células desnecessárias ao organismo sem induzir resposta inflamatória. Durante o processo há redução do volume celular, condensação e marginalização da cromatina nuclear e formação de bolhas na membrana plasmática. No final do processo, a célula é fragmentada em várias partes produzindo os corpos apoptóticos, que são fagocitados por células vizinhas ou por macrófagos sem resposta inflamatória (Figura 1). A fragmentação não aleatória do DNA, observada em géis de agarose é a característica bioquímica mais importante na identificação de células em apoptose. Além da clássica identificação morfológica, a fragmentação do DNA é um dos princípios básicos dos “kits” comerciais para identificação *in situ* de células em apoptose (Wijsman et al., 1993).

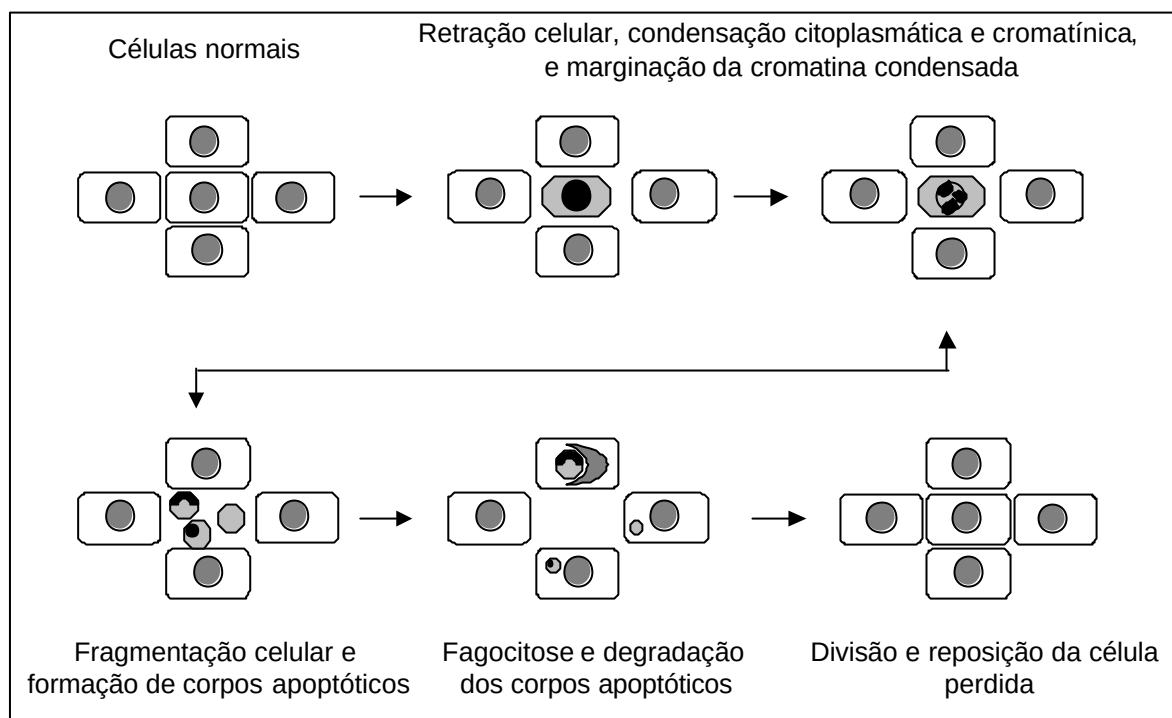


Figura 1- Representação esquemática das etapas morfológicas da apoptose

Após iniciado, o processo de apoptose se completa em poucos minutos, com a formação de corpos apoptóticos. Entretanto, a fagocitose e digestão de corpos apoptóticos levam algumas horas. Essas características podem ser observadas em microscopia eletrônica de transmissão ou mesmo na de varredura. A principal característica da apoptose é que, durante este processo, não ocorre a perda de conteúdo celular para o espaço extracelular e, por essa razão, não induz resposta inflamatória local ou dano às células adjacentes.

Esse processo é diferente da necrose, onde as membranas citoplasmáticas e nucleares fragmentam-se, liberando seu conteúdo para o meio externo, causando reação inflamatória local. A necrose é uma morte patológica ou accidental, que ocorre quando a célula é impedida de manter os seus processos vitais por lesões físicas ou

químicas, causadas por fatores externos, como altas temperaturas, radiação, trauma, produtos tóxicos e falta de oxigênio (como no infarto do miocárdio). As lesões também podem ter origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. A necrose é um processo não programado, caracterizado por edema celular, rotura de organelas e membranas celulares, com liberação do conteúdo celular induzindo resposta inflamatória nos tecidos vizinhos. Além disso, a necrose resulta em injúria inflamatória do tecido (Horta & Young, 1999).

Na microscopia eletrônica observa-se que na necrose a célula incha e as organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons, em especial o sódio e o cálcio, que são bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que se incha e rompe. A rotura libera o conteúdo celular rico em proteases e outras substâncias tóxicas no tecido vizinho. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns glóbulos brancos, em especial neutrófilos e macrófagos, convergem para o tecido em necrose e fagocitam as células mortas. A inflamação, típica da necrose, é importante para limitar infecções e remover restos de células, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem danificar tecidos normais vizinhos, às vezes de maneira devastadora (Horta & Young, 1999).

A característica marcante é que a apoptose é silenciosa. Não há, o alvoroço da inflamação como na necrose. Em geral, as células apoptóticas são reconhecidas por macrófagos e fagocitadas antes que se desintegrem. Isso evita o derrame do conteúdo celular e, assim, não há inflamação e nem lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal. Algumas células apoptóticas não são removidas logo, continuando no local, às vezes, por toda a vida. Os queratinócitos, células superficiais da pele, ao migrarem de camadas mais profundas, morrem por apoptose, mas no processo substituem o seu conteúdo pela proteína queratina e ganham uma “capa impermeável”. O cristalino dos olhos também é formado por células apoptóticas, que substituem a maior parte do seu citoplasma por proteínas denominadas cristalinas (Horta & Young, 1999).

### *Indutores e inibidores da apoptose*

A morte celular apoptótica é um processo programado e controlado por genes indutores e inibidores de auto-destruição celular, que requerem a síntese de proteínas e sinais celulares específicos (Fleisher, 1997).

Sinais externos ou internos iniciam o processo de suicídio celular e a tradução dos sinais de morte ocorre no meio intracelular envolvendo a família das proteínas Bcl-2. A execução celular acontece pela ativação das caspases, reguladas pelas Bcl-2, que servem como efetor final na apoptose. Vários membros da família de proteínas Bcl-2 interagem entre si formando tanto homo como heteroreguladores, que modulam o sinal de morte celular: o Bcl-2

previne a morte celular e o BAX e o BAK aceleram o sinal de morte celular.

Além desses foram identificados muitos indutores de apoptose. Golstein (1997) relatou que esses sinais são tipos celulares específicos e uma parte dessa lista inclui a supressão de fatores de crescimento, a radiação ionizante, o influxo de íons cálcio, o fator de necrose tumoral (TNF), a infecção viral e os glicocorticóides. Em resposta a esses sinais, ocorre uma cascata de eventos programados que resultam na destruição da célula (Figura 2).

As vias internas controladoras da apoptose envolvem numerosas influências que podem induzir ou inibir o processo. Os indutores são: a) os ativadores fisiológicos – a supressão de fatores de crescimento (IL-2), as proteínas da família do TNF como ligante do Fas, o TNF e os glicocorticóides; b) os indutores relacionados à injúria celular – gene supressor de tumor TP53; c) os agentes relacionados à terapia – quimioterapia, radicais livres; d) as toxinas – etanol. Os inibidores de apoptose são fisiológicos – fatores de crescimento (IL-2), proteínas reguladoras – proteína do gene Bcl-2, andrógenos e estrógenos (Fleisher, 1997).

Algumas vias catalíticas induzidas durante a apoptose incluem a ativação de proteases, que destroem as proteínas celulares e a ativação de nucleases, que resultam em fragmentação do DNA e degradação do RNA. As caspases, também chamadas de ICE proteases, são da família cisteína-protease, que agem como efetores da via de morte celular dos mamíferos (Golstein, 1997).

A primeira enzima descrita da família das caspases foi a ICE (*interleukin-1 $\beta$  convertin enzyme*), hoje conhecida como caspase1. A identificação da ICE foi feita pela sua função de ativar a interleucina –1 $\beta$ , proteína importante no sistema imune, que depois atraiu maior atenção pelo seu papel central na apoptose. Outras enzimas com características semelhantes foram identificadas, sendo que a família das caspases tem atualmente 14 integrantes. De início, atribuiu-se à caspase1 papel primordial na apoptose, mas estudos recentes com camundongos não-produtores dessa enzima mostraram que podem ocorrer várias formas de apoptose independente da sua presença. Em alguns casos, no entanto, a caspase1 é a enzima preponderante. Uma caspase pode clivar outras e essa fragmentação parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras em sequência até gerar uma caspase executora. Ela destrói proteínas essenciais, ativa proteínas tóxicas ou destrói aquelas que protegem a célula contra a apoptose. Todos os casos levam à morte celular (Horta & Young, 1999).

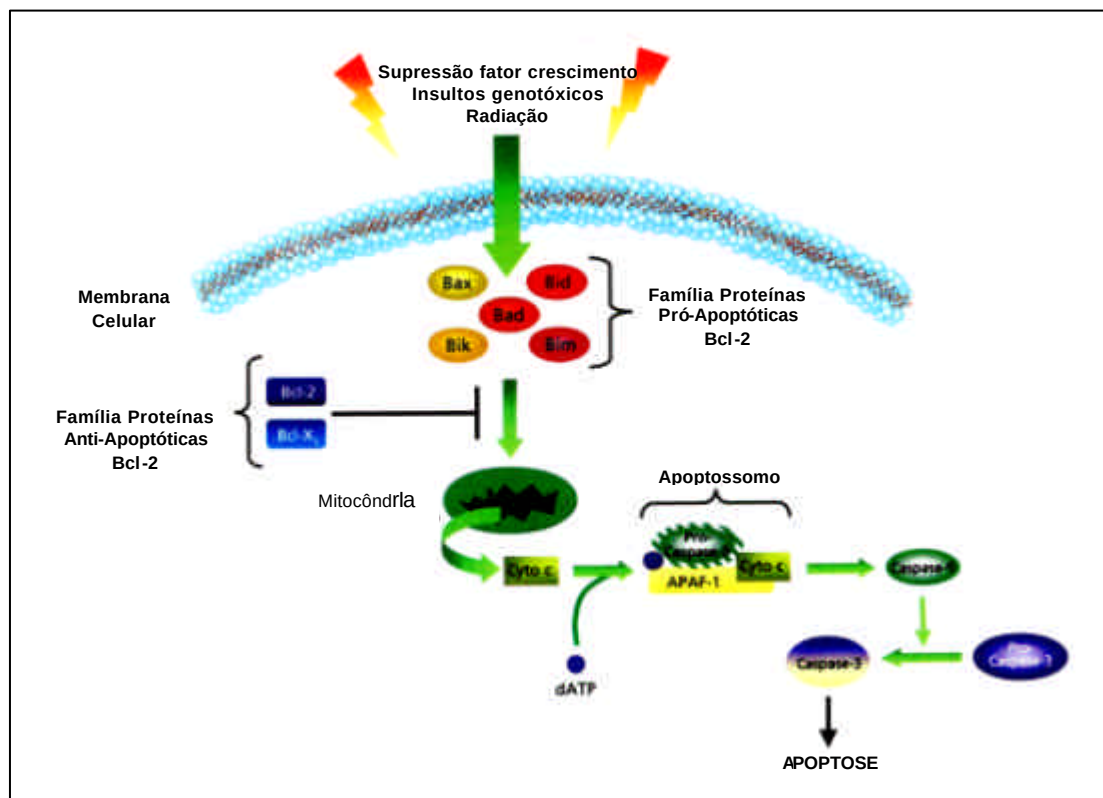


Figura 2- Representação esquemática dos eventos bioquímicos intracelulares da apoptose.

### *Apoptose no sistema reprodutor feminino*

Lang et al. (2001) publicaram, em nosso meio, excelente revisão sobre o assunto. O sistema reprodutor feminino apresenta inúmeros exemplos de morte celular e as células gonadais são modelos ideais para o estudo da influência hormonal sobre a apoptose. A análise das células apoptóticas foliculares do ovário evidencia o papel das gonadotrofinas e dos estrogênios na sobrevivência dos folículos.

A apoptose afeta as células epiteliais do endométrio e, em menor extensão, o estroma endometrial: as células apoptóticas são

escassas na fase proliferativa, aumentam na secretora e diminuem no período menstrual.

A apoptose está presente no processo de involução da glândula mamária após a cessação da lactação. A supressão do gene Bcl-2 e a regressão das células mioepiteliais e do tecido glandular estão vinculados ao processo de apoptose (Lang et al., 2001).

### *Apoptose na placenta*

Os sinais de morte celular podem estar ligados aos receptores de membrana ou estímulos do meio de forma independente que são transmitidos, aos receptores de membrana. Os dois tipos de sinais convergem para um maquinário comum de enzimas e substratos promotores da execução celular. A literatura mostra que é possível identificar os dois tipos de sinais na apoptose da placenta humana, porém, ainda são escassos os conhecimentos sobre os estímulos do meio e o controle genético da morte celular programada do trofoblasto.

Na evolução da gestação, o trofoblasto, camada epitelial de origem fetal que separa o tecido materno do fetal, sofre modificações em suas camadas celulares na evolução da gestação. Estas alterações têm como objetivo diminuir a espessura do trofoblasto para facilitar a nutrição e a oxigenação fetal. Smith et al. (1997) demonstraram a ocorrência de apoptose no trofoblasto durante toda a gestação, com maior frequência no terceiro comparado ao primeiro trimestre e na gravidez pós-termo, sugerindo ser este um processo normal da senescência placentária.

O sinciciotrofoblasto do vilo placentário humano é o epitélio nessa superfície de contacto com o sangue materno que tem citoplasma multinucleado. A regulação da apoptose no sinciciotrofoblasto é muito interessante porque esse é o único verdadeiro epitélio sincicial na biologia celular humana. A homeostasia do sinciciotrofoblasto é crucial para a manutenção de transporte do oxigênio e nutrientes ao conceito, de catabólitos para a mãe e na função de secreção hormonal. A microscopia eletrônica mostra que os núcleos com apoptose estão associados a depósitos de fibrina. Apesar de serem encontradas células com apoptose no sincício, não se conhecem os fatores que regulam esse processo. Estudos recentes mostram a expressão de múltiplos membros da cascata de apoptose: BCL-2, Fas, Fas-L, caspase-3, polimerase (PARP) no trofoblasto viloso (Ratts et al., 2000).

A identificação da apoptose nesta interface celular realça a importância de se entender os mecanismos que a controlam na placenta. Vários estudos demonstraram a existência de múltiplas cascatas de sinais pró-apoptóticos no vilo placentário. Os conhecimentos atuais, no entanto, ainda são iniciais para esclarecer como acontece a cascata de receptores de apoptose no trofoblasto, quais os fatores reguladores destas alterações no desenvolvimento da placenta, quais os controladores do processo e se o descontrole levaria à disfunção placentária.

Alteração na regulação do processo apoptótico deve causar inúmeras doenças, contribuindo para a proliferação, associada à processos neoplásicos ou à perda celular prematura, característica das doenças degenerativas auto-imunes. Estudos preliminares

sugerem que o aumento de apoptose está associado com os resultados anormais da gestação, como abortamento de primeiro trimestre e gravidez ectópica (Kokawa et al., 1998).

A incidência mais elevada de apoptose em placentas humanas e de animais, complicadas por restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), sugere que a exacerbação da apoptose pode ser o evento patológico primário. Na pré-eclâmpsia, onde a placenta também é hipóxica, foi observado maior índice de apoptose. Estudo recente demonstrou aumento de apoptose e diminuição da expressão do Bcl-2 no citotrofoblasto de placentas provenientes de gestantes com pré-eclâmpsia. Em nosso meio, Paschoini (2002) identificou elevada taxa de apoptose em placentas de gestantes com síndromes hipertensivas.

Estes exemplos evidenciam o papel da apoptose na resposta da placenta ao estresse hipóxico. A apoptose pode eliminar células anormais expostas a determinado agente agressor externo. Há trabalhos mostrando resultados de diferentes agentes alquilantes, desencadeadores de anomalias congênitas, que induzem apoptose em tecidos fetais. Apoptose pode ser induzida *in vitro* em cultura de trofoblasto exposto a citocinas (Yui et al., 1994).

Os resultados da literatura evidenciam uma grande variação nos índices de apoptose placentária, nos métodos empregados em sua avaliação e nos tipos de placentas onde o fenômeno foi detectado (Tabela 1). Analisar este fenômeno celular, que até há alguns anos era pouco conhecido, deverá ampliar os conhecimentos na área da perinatologia, aumentando o

entendimento sobre a placentação normal e a disfunção placentária nas gestações de risco.

**Tabela 1** – Sumário da análise de apoptose na placenta.

| Referência           | IG<br>(semanas)                     | Tipo de célula com<br>apoptose | Método<br>usado para<br>estudar<br>apoptose | Índice de<br>apoptose<br>(%) |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|
| Yasuda et al. (1995) | 7-12                                | ST                             | TUNEL                                       | -                            |
| Nelson (1996)        | Termo                               | ST                             | Microscopia<br>eletrônica                   | -                            |
| Smith et al. (1997)  | Primeiro e<br>terceiro<br>trimestre | -                              | HE                                          | 0,07                         |
| Qiao et al. (1998)   | 6-24                                | ST - CT                        | TUNEL                                       | < 1                          |
| Marana et al. (1998) | >37                                 | ST                             | TUNEL                                       | 15                           |
| Kokawa et al. (1998) | 6-10                                | CT                             | TUNEL                                       | 15                           |
| Chan et al. (1999)   | 8-13                                | ST                             | TUNEL<br>e HE                               | 1,59<br>0,79                 |
| Paschoini (2002)     | >37                                 | Estroma e<br>trofoblasto       | TUNEL                                       | 10,0                         |

ST = sinciotrofoblasto, CT = citotrofoblasto, IG = idade gestacional.

---

*Leituras Suplementares*

1. Crocker IP, Barrat S, Kaur M, Baker PN. The in vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblast and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2001;22:822–30.
2. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Scientific American* 1996; Dez:48–55.
3. Horta MF, Young JD. Quando a célula programa a própria morte. *Ciência Hoje* 1999; 25, 150:38–45.
4. Kerr JFR, Wyllie AH, Currier AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239–57.
5. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3–15.
6. Wyllie AH, Kerr JFR, Currier AR. Cell death, the significance of apoptosis. *Int Ver Cytol* 1980; 68:251–306.
7. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:7–12.
8. Fleisher TA. Apoptosis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 1997; 78:245–50.

9. Golstein P. Controlling cell death. *Science* 1997; 275:1081–2.
10. Lang CE, Simões MJ, Soares Jr JM, Haidar, MA, Baracat EC. Apoptose no sistema reprodutor feminino. *Femina* 2001; 29(6):361–4.
11. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obst Gynecol* 1997<sup>a</sup>; 177(1):57–65.
12. Ratts VS, Tao XJ, Webster CB, et al. Expression of BCL-2, BAX and BAK in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. *Placenta* 2000; 21:361–6.
13. Kokawa K, Chikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Molecular Hum Reprod* 1998b; 4:87–91.
14. Paschoini MC. Influência das síndromes hipertensivas sobre a apoptose placentária. [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto/SP, 2002.
15. Yui J, Garcia Loret MI, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumor necrosis factor and gamma-interferon against primary human placental trophoblast. *Placenta* 1994; 15:819–25.

## **Artigo Original I\***

### **Métodos de detecção *in situ* de proliferação celular e apoptose na placenta de ratas com diabetes grave**

---

\* Padronizado de acordo com as normas de publicação da Revista Histology and Histopathology

## RESUMO

Não existem relatos sobre estudo concomitante de proliferação celular e apoptose placentária em ratas com diabetes grave que é modelo de RCIU. O objetivo foi definir a técnica para estudar os índices de proliferação celular e de apoptose na placenta de ratas com diabetes grave, no 18º e 21º dias de prenhez. Ratas Wistar prenhes constituíram quatro grupos experimentais, de acordo com a presença ou não de diabetes, induzido pelo *Streptozotocin* e da idade de resolução da prenhez no 18º e 21º dias. Foram colhidas as placentas e analisadas a proliferação celular pelo método do PCNA e a apoptose pelos métodos de HE e TUNEL. Os dados foram comparados pelos testes *t* ou de Mann-Whitney. O índice de proliferação celular foi menor no grupo diabético de 21 dias em relação aos outros grupos, sendo que tanto o HE como o TUNEL detectaram esses índices menores no grupo diabético de 21 dias. A análise da apoptose pelo TUNEL, com índices apresentados por área de tecido placentário, parece ser mais adequada que o HE, pela rapidez na leitura das lâminas e pelos maiores índices observados. Os índices de PCNA e apoptose placentários por campo e por mm<sup>2</sup>, foram menores nos grupos diabéticos no 21º dia da prenhez. No 18º dia, estas análises foram equivalentes nos grupos controle e diabético; não houve correlação entre os índices de PCNA e apoptose no 18º e no 21º dias, nos grupos controle e diabético.

Palavras-chave: diabetes, proliferação celular, apoptose, placenta, ratas.

## SUMMARY

There are no reports of placental studies of cellular proliferation and apoptosis in rats with severe diabetes, that is a IUGR (inter-uterine growth restriction) model. The aim of this study was to define a technique for studying cell proliferation and placental apoptosis of rats with severe diabetes, on the 18<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of pregnancy. Pregnant Wistar rats were divided into four experimental groups, with and without diabetes, induced by *Streptozotocin*, and pregnancy time of 18 and 21 days resolution. Placentae were collected and cell proliferation was analyzed by the PCNA method, and apoptosis by HE and TUNEL methods; and the data were compared by *t* tests or Mann-Whitney. The cell proliferation rate was lower in the diabetic group of 21 days pregnancy, in both HE and TUNEL tests. Analyses of apoptosis by TUNEL technique wich was presented by placental tissue area, seemed to be more adequate than HE, due to quickness on slide reading, and by the higher observed indexes. The indexes of PCNA and placental apoptosis by sight and in mm<sup>2</sup> were lower in the diabetic groups on the pregnancy 21<sup>st</sup> day. On the 18<sup>th</sup> day, these analyses showed similar values in the control and the diabetic groups; there was no correlation between PCNA and apoptosis indexes on the 18<sup>th</sup> and on the 21<sup>st</sup> days, in control and diabetic groups.

Key words: Diabetes, cell proliferation, apoptosis, placenta, rats.

## INTRODUÇÃO

A apoptose é um processo celular, com características morfológicas e bioquímicas evidentes, que serve para regular as funções essenciais dos organismos multicelulares durante o desenvolvimento embrionário, a atrofia de tecidos hormônio-dependente e a homeostasia em tecidos normais adultos (Kamil et al., 1996). É um tipo ativo de morte celular programada que pode ser considerada como a antítese da mitose na regulação da homeostasia tecidual (Collins & Lopez, 1993; Schwartzman & Cidlowski, 1993). Trata-se de uma forma fisiológica de morte celular que, juntamente com a mitose, controla o número de células num determinado tecido (Smith et al., 1997<sup>a</sup>).

A apoptose pode ser detectada por vários métodos, mas os mais utilizados são: a identificação das características morfológicas na microscopia de luz e eletrônica e os testes para detectar fragmentação de DNA pelo uso de eletroforese em gel ou pela detecção *in situ* pelo método do TUNEL (TDT-mediated bio-dUTP nick end labelling) ou ISEL (in situ end labelling) (Sander, 1997).

Kerr et al. (1972), em seu trabalho original sobre apoptose, relataram que estudos adicionais precisavam ser realizados para se determinar sua extensão e frequência em órgãos e tecidos de animais adultos saudáveis. Isto porque não se conhecem os fatores que determinam quais células serão afetadas. Apesar desse artigo ter sido escrito há mais de 25 anos, é recente sua descrição de células da placenta. Smith et al., 1997<sup>a</sup> foram os primeiros a relatar

e quantificar a presença dessas células na placenta, porém, existem outros trabalhos enfatizando o papel da apoptose nos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos da placenta (Kim et al., 1995; Salafia et al., 1996; Amato et al., 1996; Nelson, 1996).

A apoptose é um importante mecanismo no desenvolvimento normal e na diferenciação da placenta humana e está presente em todos os tipos de células placentárias (Smith et al., 1997<sup>a</sup>). Este fato está de acordo com a sugestão de Wyllie & Duvall (1992), da participação no processo de senescência celular normal que ocorre durante o envelhecimento tecidual, tornando-o mais susceptível ao estímulo apoptótico.

A apoptose também tem papel significativo nos estágios de desenvolvimento placentário, incluindo invasão intersticial e endovascular (Chan et al., 1999), tolerância imuno-materna (Mor et al., 1998) e modificação no trofoblasto placentário (Smith et al., 1997<sup>a</sup>; Huppertz et al., 1999; Mayhew et al., 1999).

A frequência de células apoptóticas na placenta é maior no terceiro trimestre quando comparado com o primeiro trimestre de gravidez (Smith et al., 1997<sup>a</sup>) e está associada à menor expressão do gene bcl-2 (Kim et al., 1995). A taxa de apoptose também está elevada em gravidez humana associada à restrição no crescimento fetal (Waddell et al., 2000). Esta patologia, parece que acelera o processo de apoptose nas células da placenta. Trabalhos recentes da literatura têm demonstrado que nos casos de RCIU há elevada incidência de apoptose nas placentas, sugerindo que este mecanismo de morte celular programada é o fator chave no crescimento fetal (Waddell et al., 2000; Smith et al., 1997<sup>b</sup>).

Os recém-nascidos do modelo experimental de diabetes grave e prenhez apresentam restrição do crescimento intra-uterino (RCIU). Na tentativa de detectar o momento na prenhez em que ocorre a RCIU foi realizado trabalho experimental com resolução da prenhez no 18º e no 21º dias. Observou-se que, no 18º dia, os pesos fetais dos grupos controle e diabético eram semelhantes mas, era diferenciada a deposição de glicogênio placentário. No diabetes grave houve manutenção do glicogênio placentário no 21º dia e no grupo controle o glicogênio placentário desapareceu entre o 18º e 21º dias de prenhez (Calderon et al., 1999). Esta permanência do glicogênio na placenta poderia servir tanto como substrato às células placentárias mantendo a proliferação celular até o final da prenhez como agente tóxico celular aumentando a morte celular. Estudar a apoptose e a proliferação celular nas placentas de ratas com diabetes grave entre o 18º e 21º dias de prenhez, permitirá entender melhor os achados placentários em ratas com diabetes grave. Como não foram encontrados trabalhos na literatura sobre proliferação celular e apoptose em placentas de ratas com diabetes grave, este trabalho foi delineado tendo como objetivo geral definir a técnica para estudar os índices de proliferação celular e de apoptose celular na placenta de ratas com diabetes grave, no 18º e 21º dias de prenhez. Os objetivos específicos foram: comparar dois métodos de detecção *in situ* de apoptose na placenta de ratas com diabetes grave: HE e TUNEL; quantificar os índices de proliferação celular e apoptose por campo e por mm<sup>2</sup> e correlacioná-los entre si nas placentas de ratas controle e com diabetes grave, no 18º e 21º dias de prenhez.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. *Animais e ambientes de experimentação*

Foram utilizadas ratas Wistar virgens, em idade reprodutiva (três meses), pesando aproximadamente 220g, e ratos Wistar, pesando em torno de 250g, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp do Campus de Botucatu. As fêmeas foram adaptadas durante uma semana às condições ambientais do biotério do Laboratório Experimental de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Permaneceram em gaiolas coletivas com capacidade máxima de cinco animais, sob temperatura ambiente mantida entre 21 e 25°C e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro). Após o período de adaptação, as ratas foram sorteadas para compor os grupos controle e com diabetes induzido.

### 2. *Grupos experimentais*

As fêmeas foram sorteadas em quatro grupos experimentais:

Grupo controle 18 dias: ratas prenhes não diabéticas, que receberam diariamente água destilada e ração basal *ad libitum* durante toda prenhez. No 18º dia de prenhez, foi realizada a laparotomia e histerotomia para a colheita das placentas (n = 5).

Grupo controle 21 dias: ratas prenhes não diabéticas, que receberam diariamente água destilada e ração *ad libitum* durante toda a prenhez. No 21º dia de prenhez, foi realizada a laparotomia e histerotomia cesárea para a colheita das placentas (n = 5).

Grupo diabético 18 dias: ratas prenhes diabéticas, que receberam diariamente água destilada e ração *ad libitum* durante toda a prenhez. No 18º dia de prenhez, foi realizada a laparotomia e histerotomia para a colheita das placentas (n = 5).

Grupo diabético 21 dias: ratas prenhes diabéticas, que receberam diariamente água destilada e ração *ad libitum* durante toda a prenhez. No 21º dia de prenhez, foi realizada a laparotomia e histerotomia para a colheita das placentas (n = 5).

### 3. *Protocolo Experimental*

Foi um projeto prospectivo de experimentação animal, que seguiu o modelo de diabetes e prenhez em ratas. Após a adaptação dos animais e sorteio para os grupos experimentais, desenvolveram-se os períodos diabetogênico, de acasalamento e de prenhez (Calderon et al., 1992).

#### 3.1. *Período diabetogênico*

O *streptozotocin* (STZ) foi a droga utilizada para a indução do diabetes e o período para avaliação do efeito diabetogênico foi de 15 dias.

As ratas normoglicêmicas sorteadas para indução do diabetes receberam injeção única de *streptozotocin* (SIGMA Chemical Company, ST. Louis, MO, EUA), na dose de 40 mg/kg/peso por via intravenosa. As sorteadas para o grupo controle receberam, também por via intravenosa, solução salina NaCl a 0,9% em volume equivalente à droga diabetogênica, calculado para uma rata de mesmo peso (Calderon et al., 1992).

Foram interpretados como indícios de hiperglicemia: a ingestão excessiva de água (polidipsia) e ração (polifagia), associadas à perda ou manutenção do peso, alterações no comportamento e aspecto dos animais, tais como irritabilidade, dor à manipulação, turgor diminuído da pele e pêlos eriçados. Esses fatores foram avaliados do primeiro ao décimo quinto dia após a administração do STZ. Também foi indicativo de hiperglicemia o aumento do grau de umidade na forração da gaiola acompanhado de odor característico de uréia. Na presença desses dados clínicos, foi determinada a glicemia, considerando o limite mínimo de 200 mg/dL para caracterizar o diabetes grave (Calderon et al., 1992; Calderon, 1994).

### *3.2. Período de acasalamento*

Após o período diabetogênico, iniciou-se a fase de acasalamento, onde as ratas foram distribuídas quatro a quatro em gaiolas de polietileno forradas com maravalha, e colocadas na presença de um rato macho no final da tarde. Na manhã seguinte, após a retirada dos machos, foram colhidos os esfregaços vaginais pela introdução de cotonete embebido em solução fisiológica NaCl a 0,9%. A presença de espermatozóides em esfregaço característico de fase estral confirmou o acasalamento. Este dia foi considerado como o dia zero da prenhez (Calderon et al., 1992; Calderon, 1994).

### 3.3. *Período de prenhez*

Na prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais por 18 ou 21 dias, pesadas diariamente e observadas quanto ao comportamento e a ingestão hídrica e alimentar. No 18º ou 21º dias, as ratas foram anestesiadas por inalação de éter etílico e submetidas à laparotomia e histerotomia, onde as placentas e os fetos foram, imediatamente, retirados e pesados. A seguir as mães foram mortas por esgotamento da volemia (Calderon et al., 1992).

## 4. *Variáveis e Técnicas*

### 4.1. *Glicemia materna*

Os níveis séricos de glicemia foram monitorados por leitura de glicofita (Blood Glucose Monitoring Test Strips Ultra +, HDI Home Diagnostics, Inc, Flórida, EUA), em sangue obtido por punção da parte distal da cauda da rata. Esta fita foi introduzida em glicosímetro específico, expressando os valores da glicemia em miligramas por decilitro (mg/dL). As dosagens foram realizadas nos dias zero, sétimo, décimo quarto e décimo oitavo ou vigésimo primeiro da prenhez.

### 4.2. *Processamento das placentas*

Os procedimentos relativos ao processamento das placentas para o estudo dos índices de proliferação celular pela reação de imuno-histoquímica (PCNA) e de apoptose pela coloração HE e técnica do TUNEL, estão esquematizados na Fig. 1.

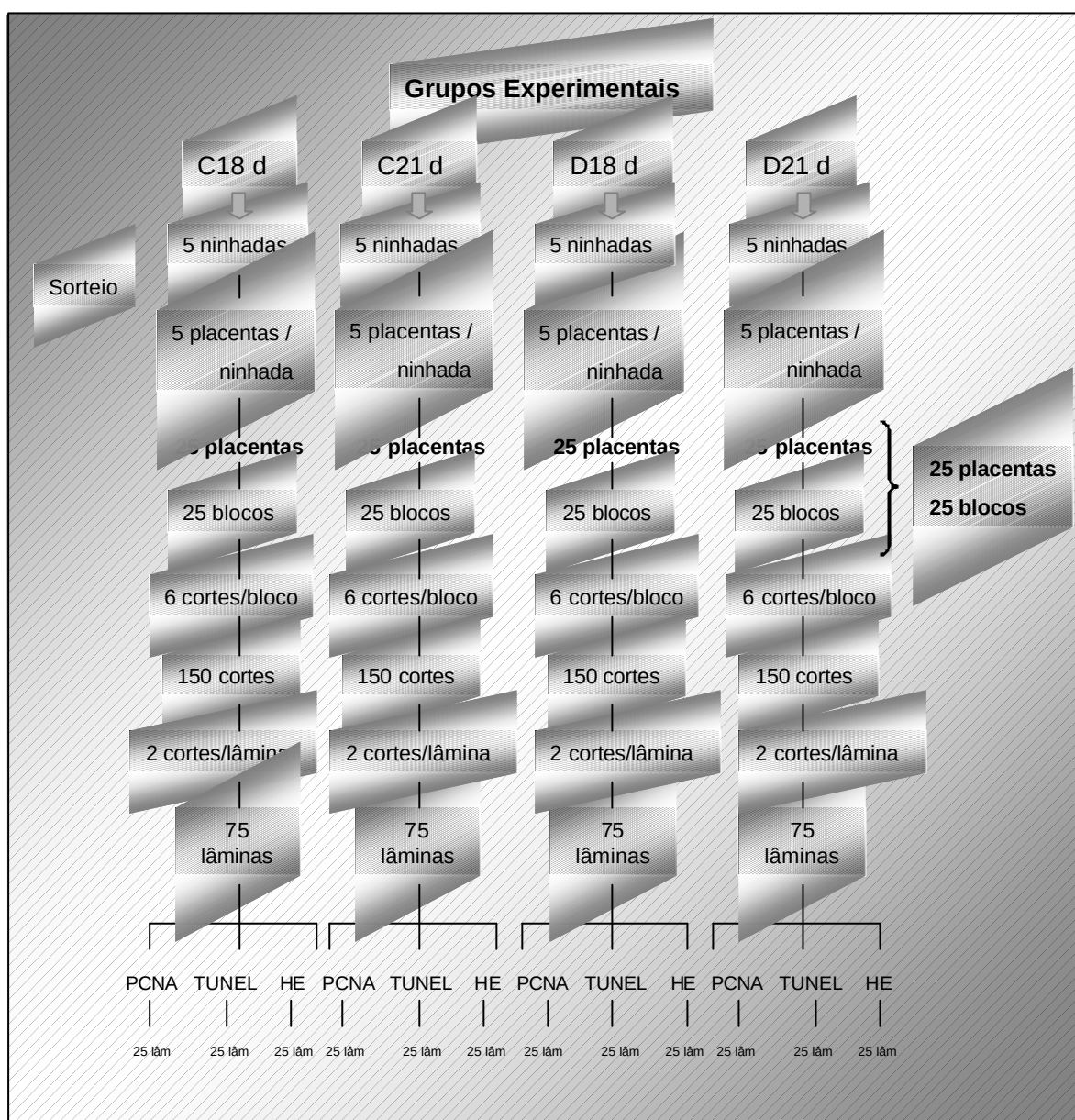


**Fig. 1.** Representação esquemática do processamento das placentas para o estudo histológico de proliferação celular (PCNA) e apoptose (HE e TUNEL).

De cada ninhada foram sorteadas cinco placentas, que totalizaram 25 em cada grupo experimental. As placentas foram cortadas transversalmente na região labiríntica (Davies & Glasser, 1968), sendo desprezada a região do cordão umbilical. A seguir, os

fragmentos foram fixados em formalina tamponada à 10% por 24 horas. Após esse tempo, as amostras placentárias foram lavadas em água corrente, onde permaneceram por mais 24 horas. Depois disso, esse material foi aparado e colocado em cassetes plásticos identificados e mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

Para a confecção dos blocos, os fragmentos placentários foram desidratados em banhos sucessivos de álcool a 85%, a 95% e absoluto, por três vezes, durante uma hora em cada concentração. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III pelo período de uma hora para cada reagente. Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina a 60°C, totalizando 25 blocos para cada grupo experimental.

Os blocos de parafina foram processados em micrótomo (Spiencer 820 Microtome, EUA), para a obtenção de cortes histológicos de 7µm de espessura.

Considerando os 25 blocos, cada um com seis cortes histológicos, montados dois a dois por lâmina, foram obtidos 150 cortes e confeccionadas 75 lâminas por grupo experimental, totalizando 600 cortes/300 lâminas nos quatro grupos. As 75 lâminas de cada grupo foram distribuídas igualmente para as três técnicas propostas, PCNA, HE e TUNEL (25 lâminas cada). Ao final, foram processadas 100 lâminas para cada técnica, totalizando 300 lâminas avaliadas.

De cada bloco foram, selecionados seis cortes e montados, dois a dois, em lâminas codificadas, que permaneceram em estufa

(Famen 002 CB, Brasil) à 60°C por 24 horas, para maior adesão dos cortes histológicos à superfície da lâmina.

#### *4.3. Determinação dos índices de proliferação celular (PCNA) e de apoptose (HE e TUNEL)*

Para estes estudos todas as lâminas foram pré-tratadas com solução de poly-D-lisina (Sigma Chemical CO, MO, EUA). A seguir, permaneceram em estufa (Famen 002 C, Brasil) à 60°C por 12 horas e, posteriormente, foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- a) Desparafinização: em três banhos de xilol por 10 minutos cada;
- b) Hidratação: realizada pela passagem do material por três banhos sucessivos em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% e água destilada;

Após estas etapas, o processamento se diferenciou conforme a técnica empregada.

##### *4.3.1. Índice de proliferação celular pela reação imuno-histoquímica do PCNA\**

O PCNA, antígeno nuclear de células proliferativas específico para ratos, é uma proteína acídica e não histônica de 36 kDa que atua como um co-fator da DNA polimerase  $\delta$ , importante para o processo de síntese de DNA (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987; McCormick & Hall, 1992).

---

\* Foram utilizados kits de imuno-histoquímica para PCNA (Novocastra, EUA).

A expressão do antígeno nuclear de proliferação nuclear (PCNA) foi avaliada pela técnica imuno-histoquímica do complexo Avidina-Biotina (ABC) (Hsu et al.,1981).

As lâminas, já desparafinizadas e hidratadas, passaram pelos seguintes procedimentos:

- a) Bloqueio da peroxidase endógena: incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à 3% em álcool metílico, durante 10 minutos;
- b) Bloqueio de ligações inespecíficas: mergulho das lâminas em solução de soro normal de equino por, no mínimo, 20 minutos;
- c) Incubação com anticorpo primário: aplicação em cada corte histológico de 100 a 200  $\mu$ l de anticorpo primário monoclonal anti-PCNA (Novocastra, EUA) que foram mantidos em bandeja de imuno-histoquímica (Shandon, EUA) em sistema de câmara úmida na geladeira à 4°C por 12 horas;
- d) Incubação com anticorpo secundário (Novocastra, EUA): aplicação em cada corte histológico de 100 a 200  $\mu$ l anti-IgG universal (1:200 em ABS à 1%) para as reações de PCNA, incubado, por uma hora, à temperatura ambiente;
- e) Reagente ABC (Novocastra, EUA): a preparação foi feita adicionando gotas de solução A (avidina) e de solução B (biotina conjugada com peroxidase) em 5 ml de PBS. A solução permaneceu em repouso por 30 min, antes de ser aplicada, na dose de 100 a 200  $\mu$ l/ lâmina. As lâminas foram submetidas à incubação por 45 minutos, à temperatura ambiente;
- f) Incubação com solução de 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (Sigma Chemical CO, MO, EUA): o

preparo da solução foi feito colocando-se 3,75 mg de DAB em 10 ml de tampão Tris-HCl (pH = 7,4) e adicionando 2,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%. A mistura dos componentes desta solução foi feita, obrigatoriamente, na sequência em que aparece no texto e imediatamente antes do uso. Foram aplicados de 100 a 200 µl/lâmina da solução DAB ativada em cada lâmina histológica por quatro minutos, à temperatura ambiente;

- g) Contra-coloração: as lâminas permaneceram por um minuto em uma cuba com hematoxilina de Harris à 50%, foram lavadas em água corrente, em seguida, colocadas em água amoniacal e, nova lavagem em água corrente. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% (três vezes), e por passagem em xilol (três vezes). Posteriormente, foi feita a montagem das lâminas com lamínula (24 × 32 mm) em resina sintética Permount (Fisher, EUA).

A partir da hidratação e com exceção do item b, as lâminas foram lavadas três vezes durante cinco minutos cada em solução de PBS 0,1M (solução fosfato tamponada, pH = 7,2). Entre as etapas o excesso da solução foi retirado com um compressor-aspirador (Neuoni MB, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha).

Todas as células PCNA positivas foram contadas em cinco campos microscópicos semi-sucessivos de placentas de ratas dos grupos controle e diabético, utilizando-se microscópio Leica DMLB (Alemanha) na objetiva de 40× e com a utilização de gradícula.

Os índices de células PCNA positivas foram determinados dividindo-se o número de células PCNA positivas pelo número de

campos analisados de cada placenta nos diferentes grupos experimentais. O índice médio de células em proliferação celular por  $\text{mm}^2$  foi calculado pelo número total das células PCNA positivas encontradas nos cinco campos mensurados, dividida pela área circular em  $\text{mm}^2$ .

$$I_{\text{Proliferação/campo}} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área total dos campos analisados}}$$

$$I_{\text{Proliferação/mm}^2} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área circular em mm}^2}$$

#### 4.3.2. Determinação da apoptose na placenta pela coloração em Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas, já desparafinizadas e hidratadas, foram submetidas aos seguintes procedimentos: a) coloração: hematoxilina de Harris por cinco minutos, duas lavagens em água corrente e permanência em água corrente até ficar azul, diferenciar em álcool 70% – HCL 0,5% para tirar o excesso de corante, duas lavagens em água corrente. Eosina por dois minutos e bateria de desidratação (álcool I, II, III, IV e V por cinco minutos cada passagem); b) diafanização: álcool xilol 95% por cinco minutos, xilol I por cinco minutos e xilol II por cinco minutos.

Terminada a coloração, as lâminas foram transferidas para outro suporte e levadas para a montagem de lamínulas (24 × 32

mm) em meio Permount (Fisher, EUA). Após a montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas. Todos os reagentes utilizados na coloração foram obtidos da Merck (Alemanha).

A identificação em HE de células em apoptose na placenta foi feita pela identificação dos padrões morfológicos de apoptose: marginação, condensação cromatínica, retração e fragmentação celular (Wyllie et al., 1980). Todas as células apoptóticas foram contadas em 50 campos microscópicos semi-sucessivos da placentas de ratas controle e diabéticas, utilizando-se microscópio Axiophot (Alemanha) (objetiva de 40× e optovar de 2×).

Os índices de células apoptóticas por campo foram determinados dividindo-se o número de células apoptóticas pelo número de campos analisados de cada placenta nos diferentes grupos experimentais. O índice médio de apoptose por mm<sup>2</sup> foi calculado pelo número total das células apoptóticas encontradas em 50 campos mensurados, divididas pela área circular em mm<sup>2</sup>.

$$I_{\text{apoptose/campo}} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Número de campos analisados}}$$

$$I_{\text{apoptose/mm}^2} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área circular em mm}^2}$$

#### 4.3.3. *Índice de apoptose pelo método de TUNEL\**

A técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated d UTP nick end-labeling) tem habilidade de detectar as alterações bioquímicas iniciais que ocorrem nas células apoptóticas antes que se manifestem as alterações morfológicas (Chan et al., 1999).

As lâminas, já desparafinizadas e hidratadas, foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- a) As lâminas com cortes histológicos foram colocadas em cuba com tampão citrato (pH = 6) e levadas ao forno de microondas (CCE, Brasil) por 10 minutos (dois ciclos de 5 minutos cada) na potência máxima de 1300 W. Após este procedimento, as lâminas permaneceram no forno de microondas por mais 20 minutos à temperatura ambiente;
- b) Permeabilização dos cortes histológicos: aplicação nas lâminas de 100 µl de proteinase K (2mg/ml) em tampão Tris10mM (pH = 8) durante 20 minutos à temperatura ambiente;
- c) Estabilização para a reação de marcação pela diluição do tampão de equilíbrio 1:5 em água destilada: cada lâmina recebeu 100µl dessa diluição, durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- d) Reação de marcação com 3 µl da enzima TdT mais 57 µl da mistura da reação de marcação (TdT): cada lâmina recebeu 60µl dessa diluição, durante uma hora e meia à temperatura de 37°C;

---

\* Foram utilizados kits de apoptose para avaliação do TUNEL (Oncogene, EUA).

- e) Finalização da reação de marcação: cada lâmina recebeu 100 µl de tampão de parada de reação, durante cinco minutos à temperatura ambiente;
- f) Inativação de peroxidase endógena pela imersão das lâminas durante 5 minutos na solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1:10 em metanol;
- g) Detecção da reação: cada lâmina recebeu 100 µl de tampão de bloqueio durante 10 minutos à temperatura ambiente, e também o conjugado (50 vezes) diluído 1:50 em tampão de bloqueio, onde cada lâmina recebeu 100 µl dessa diluição, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, um tablete de DAB e um tablete de água oxigenada/uréia, foram dissolvidos em 1 ml de água: cada lâmina recebeu 100 µl dessa diluição, durante 10 minutos à temperatura ambiente;
- h) Contra-coloração: as lâminas foram colocadas em uma cuba com hematoxilina de Harris à 50%, permanecendo por um minuto; foi feita a lavagem em água corrente, em seguida a passagem da lâminas em água amoniacal e, novamente, a lavagem em água corrente. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% (três vezes), e por passagem em xilol (três vezes). Posteriormente, foi feita a montagem das lâminas com lamínula (24 × 32mm) em resina sintética Permound.

A partir da hidratação, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão Tris-NaCl (pH = 7,4). Entre as etapas o excesso da solução foi retirado com o compressor aspirador (Neuoni MB, Brasil). Uma lâmina de controle positivo de apoptose fornecida pelo fabricante foi incluída nas reações (células HL60 de leucemia promielocítica tratadas com 0,5 µg/ml de actinomicina D).

A identificação pelo método de TUNEL de células em apoptose na placenta foi feita pela visibilização de núcleos com marcação positiva, corados em marrom pela reação de DAB. Todas as células apoptóticas foram contadas em 25 campos microscópicos semi-sucessivos das placentas de ratas dos grupos controle e diabético, utilizando-se microscópio Axiophot (Alemanha) na objetiva de 40× e optovar de 2×. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha).

Os índices de células apoptóticas por campo foram determinados dividindo-se o número de células apoptóticas pelo número de campos analisados de cada placenta nos diferentes grupos experimentais. O índice médio de apoptose por mm<sup>2</sup> foi calculado pelo número total das células apoptóticas encontradas em 25 campos mensurados, divididas pela área circular em mm<sup>2</sup>.

$$I_{\text{apoptose/campo}} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área de campos analisados}}$$

$$I_{\text{apoptose/mm}^2} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área total circular em mm}^2}$$

## 5. *Análise Estatística*

Os dados relativos aos índices placentários de apoptose e proliferação celular foram comparados pelo teste *t* ou pelo teste de Mann-Whitney, para amostras independentes (Zar,1984). Estes

testes foram aplicados na dependência do padrão de distribuição dos dados (com normalidade ou não). Para o cálculo das correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (Snedecor e Cochran, 1980) entre os índices de proliferação celular (PCNA) e de apoptose (TUNEL). A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

#### *6. Aspectos éticos*

O projeto foi desenvolvido dentro dos preceitos éticos recomendados em experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, aos 29 de outubro de 2001 (Anexo 1).

## RESULTADOS

A Fig. 2 mostra o padrão de marcação de células placentárias com o anticorpo anti-PCNA. O índice de proliferação celular (células PCNA positivas) nas placentas de ratas diabéticas no 21º dia foi menor que os das ratas controle no 18º e 21º dias e diabéticas no 18º dias, respectivamente (Tabela 1), na representação dos dados por campo microscópico ou por mm<sup>2</sup>.

A Fig. 3 mostra os cortes histológicos de placentas coradas pelo HE. Os índices de células placentárias em apoptose, identificadas em HE, foram menores nas placentas dos grupos de ratas diabéticas, em ambos os grupos, no 18º e 21º dias. Esse índice foi menor nas placentas dos grupos de ratas diabéticas no 21º dias quando comparado ao índice dos grupos de ratas diabéticas no 18º dias de prenhez (Tabela 2).

A Fig. 4 expõe as lâminas histológicas de placenta processadas pela técnica do TUNEL. Os índices de apoptose determinados pela técnica do TUNEL foram cerca de 5,27 a 7,00 e de 22,75 a 46,50 vezes maiores que os mesmos índices determinados na análise pelo HE, por campo microscópico ou por mm<sup>2</sup>, respectivamente (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de correlação de Spearman entre os níveis de proliferação celular e apoptose avaliados nos períodos de 18 e 21 dias de prenhez. Não existe correlação entre os níveis de proliferação celular e apoptose na placenta de ratas controle e diabéticas de 18 e 21 dias de prenhez.

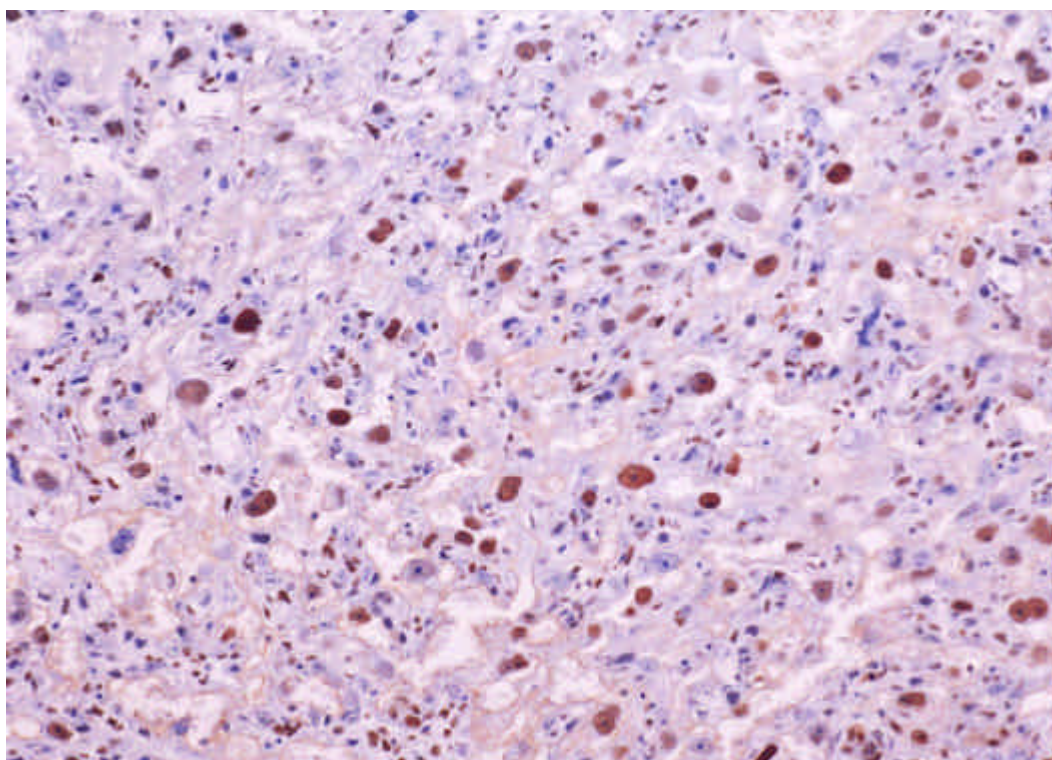


**Fig. 2.** Corte histológico de placenta processado para imunohistoquímica, mostrando células placentárias PCNA positivas (625×).

**Tabela 1.** Índices de proliferação celular ( $I_{PCNA}$ ) nas placentas de ratas controle e diabéticas por campo e por  $mm^2$  no 18º e 21º dias de prenhez de ratas do grupo controle e diabético.

| $I_{PCNA}$         | Controle          |                      | Diabete           |                      |
|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                    | 18ºdia            | 21ºdia               | 18ºdia            | 21ºdia               |
| $I_{PCNA}/campo^*$ | $3,33 \pm 1,37^a$ | $3,92 \pm 1,12^{a1}$ | $3,74 \pm 1,37^a$ | $1,51 \pm 0,50^{b1}$ |
| $I_{PCNA}/mm^2^*$  | $0,62 \pm 0,25^a$ | $0,73 \pm 0,21^{a1}$ | $0,70 \pm 0,25^a$ | $0,28 \pm 0,09^{b1}$ |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) no 18º e 21º dias ( $p \geq 0,05$ ), para cada variável estudada.

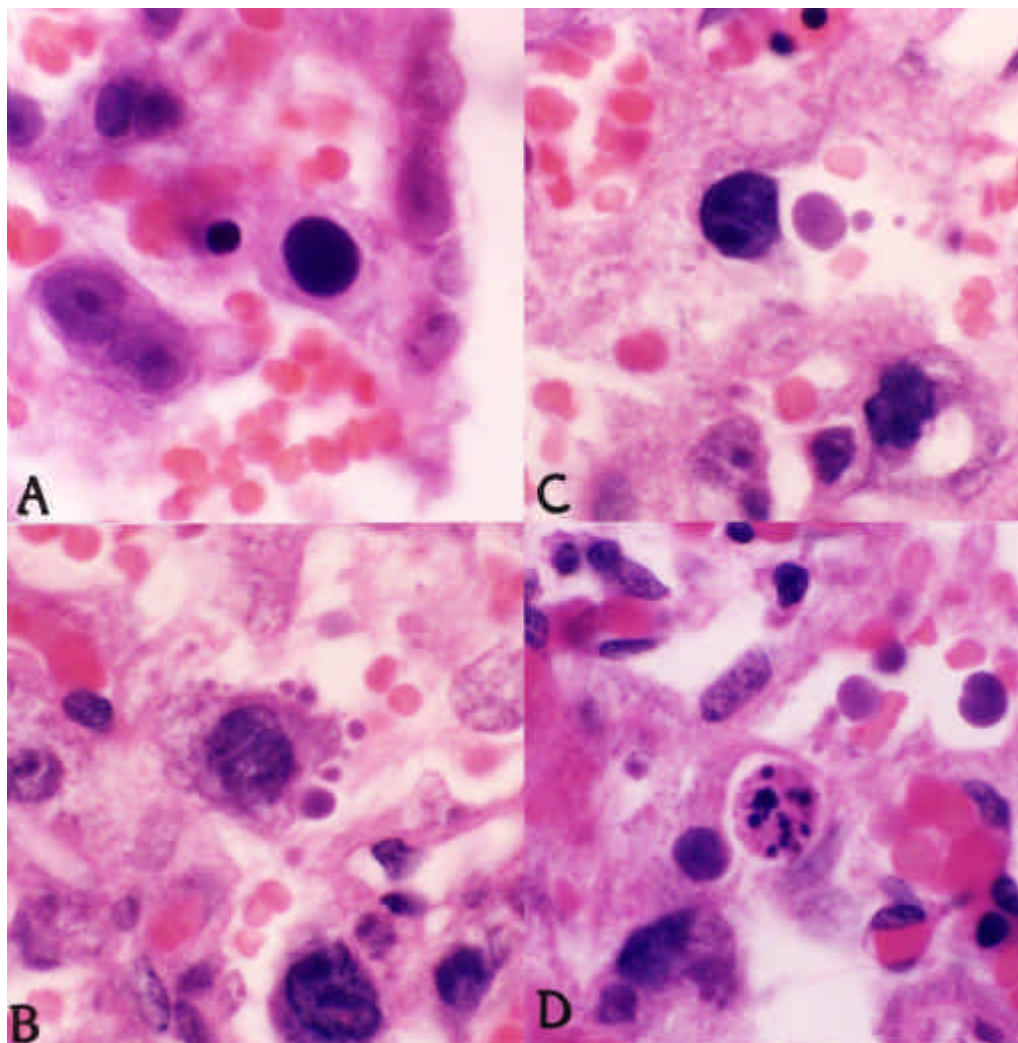


**Fig. 3.** Cortes histológicos de placenta corados com HE mostrando figuras de células em apoptose: A) Célula mostrando núcleo com cromatina visivelmente condensada (625×); B) Célula mostrando fragmentação e condensação citoplasmáticas focais (625×); C) Célula mostrando condensação cromatínica, fragmentação e condensação citoplasmáticas (625×); D) Célula mostrando fragmentação e condensação cromatínica com visível retração celular (625×).

**Tabela 2.** Índices de apoptose ( $I_{\text{apoptose}}$ ): TUNEL e HE ( $I_{\text{TUNEL}}$  e  $I_{\text{HE}}$ ) nas placentas de ratas controle e diabéticas por campo e por  $\text{mm}^2$  no 18° e 21° dias de prenhez de ratas do grupo controle e diabético.

| $I_{\text{apoptose}}$      | Controle          |                      | Diabética         |                       |
|----------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
|                            | 18° dia           | 21° dia              | 18° dia           | 21° dia               |
| $I_{\text{TUNEL/campo}^*}$ | $1,37 \pm 0,21^a$ | $1,39 \pm 0,25^{a1}$ | $1,35 \pm 0,22^a$ | $0,56 \pm 0,15^{b1}$  |
| $I_{\text{TUNEL/mm}^2}^*$  | $0,91 \pm 0,14^a$ | $0,93 \pm 0,16^{a1}$ | $0,90 \pm 0,14^a$ | $0,37 \pm 0,10^{b1}$  |
| $I_{\text{HE/campo}^*}$    | $0,26 \pm 0,11^a$ | $0,16 \pm 0,04^{a1}$ | $0,20 \pm 0,04^a$ | $0,08 \pm 0,03^{b1}$  |
| $I_{\text{HE/mm}^2}^*$     | $0,04 \pm 0,01^a$ | $0,02 \pm 0,01^{a1}$ | $0,03 \pm 0,01^a$ | $0,01 \pm 0,004^{b1}$ |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) no 18° e 21° dias ( $p \geq 0,05$ ), para cada variável estudada.

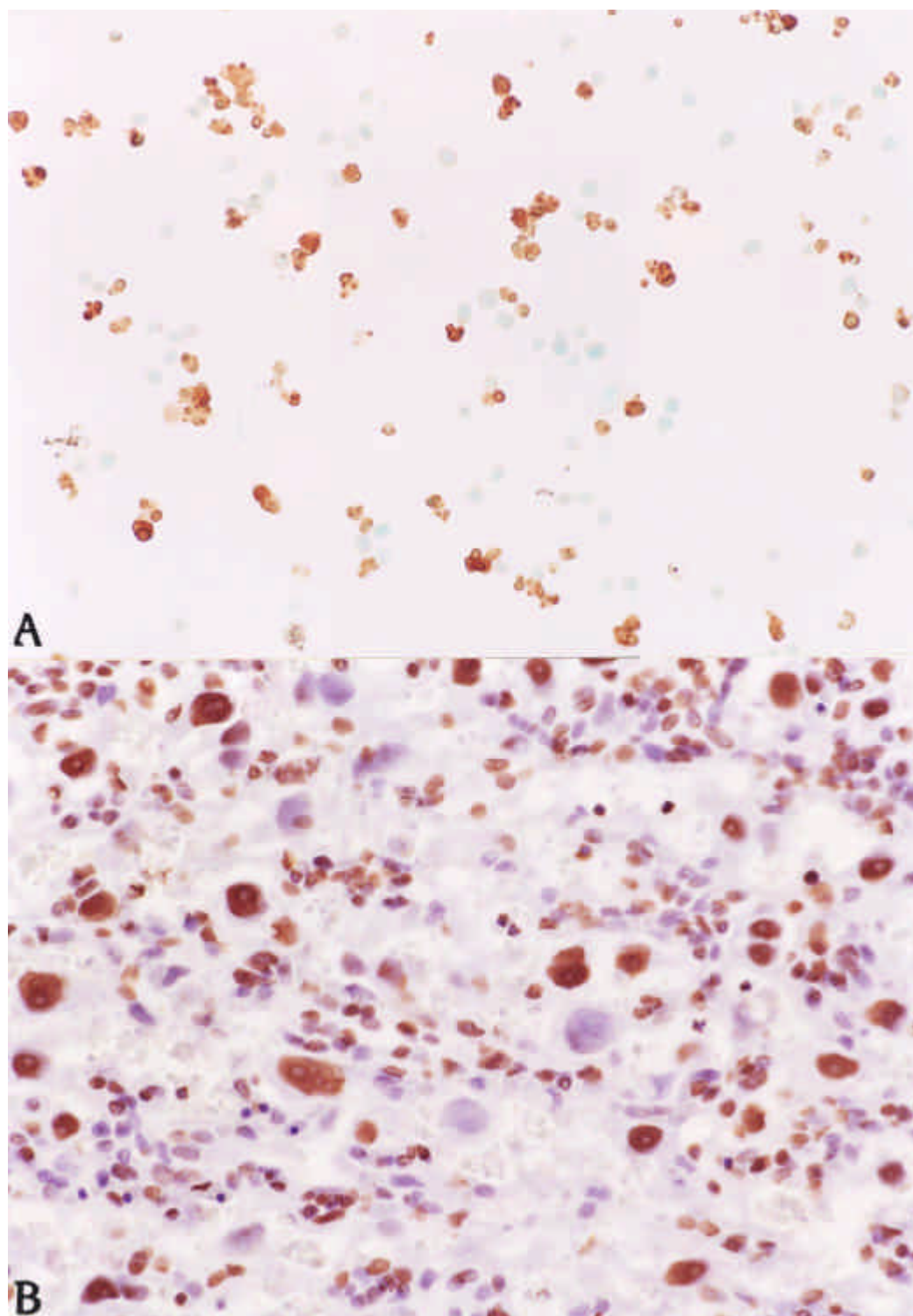


**Fig. 4.** Lâminas histológicas processadas pelo método de TUNEL: A) Células HL60 em apoptose (controle positivo) (225×); B) Células placentárias em apoptose (225×).

**Tabela 3.** Coeficiente de correlação Spearman ( $r_s$ ) entre os índices de proliferação celular ( $I_{PCNA}$ ) e de apoptose placentária ( $I_{TUNEL}$ ) por campo e por  $mm^2$  no 18° e 21° dias de prenhez de ratas dos grupos controle e diabético .

| $r_s I_{PCNA} / I_{TUNEL}$              | Controle          |                      | Diabética         |                      |
|-----------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                                         | 18°dia            | 21°dia               | 18°dia            | 21°dia               |
| $I_{PCNA}/campo^*$                      | $3,33 \pm 1,37^a$ | $3,92 \pm 1,12^{a1}$ | $3,74 \pm 1,37^a$ | $1,51 \pm 0,50^{b1}$ |
| $I_{apoptose}/campo^*$                  | $1,37 \pm 0,21^a$ | $1,39 \pm 0,25^{a1}$ | $1,35 \pm 0,22^a$ | $0,56 \pm 0,15^{b1}$ |
| $r_s I_{PCNA}/TUNEL \text{ campo}^{**}$ | -0,29             | 0,20                 | 0,23              | 0,009                |
| $I_{PCNA} / mm^2^*$                     | $0,62 \pm 0,25^a$ | $0,73 \pm 0,21^{a1}$ | $0,70 \pm 0,25^a$ | $0,28 \pm 0,09^{b1}$ |
| $I_{apoptose} / mm^2^*$                 | $0,91 \pm 0,14^a$ | $0,93 \pm 0,16^{a1}$ | $0,90 \pm 0,14^a$ | $0,37 \pm 0,10^{b1}$ |
| $r_s I_{PCNA}/TUNEL mm^2^{**}$          | -0,29             | 0,22                 | 0,21              | -0,02                |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) no 18° e 21° dias ( $p \geq 0,05$ ), para cada variável estudada.

\*\*Valores não significativos ( $p > 0,05$ )

## DISCUSSÃO

A cinética de crescimento das placentas de ratas em final de prenhez foi alterada pelo diabetes grave. Os índices médios de proliferação celular e apoptose nas placentas de ratas diabéticas graves foram menores que os respectivos índices de placentas de ratas controle de 21 dias e de ratas controle e diabéticas de 18 dias de prenhez.

Os índices de células apoptóticas por campo e por  $\text{mm}^2$  conseguiram detectar o mesmo fenômeno, independente da técnica usada HE ou TUNEL. O mesmo ocorreu com o índice de proliferação celular por campo e por  $\text{mm}^2$ .

A análise de apoptose pelo método do TUNEL é mais rápida e eficiente que a análise pelo HE. Embora a maioria dos trabalhos de apoptose em placentas humanas apresentem os índices de apoptose em porcentagem (contagem total de células analisadas ou estimativa do número médio de células por campo microscópico), a apresentação dos dados por área parece ser uma forma equivalente. A estimativa de apoptose por área ( $\text{mm}^2$ ) só não pode ser considerada válida se o tecido placentário apresentar alterações histológicas grosseiras tais como, hipertrofia ou atrofia e extensas áreas de necrose ou degeneração.

Os dados sobre os níveis de proliferação celular e apoptose foram apresentados na forma de contagem de células por campo microscópico ou por área ( $\text{mm}^2$ ). A apresentação por área parece mais adequada para a comparação entre os índices de PCNA e

apoptose, visto que a contagem por campo não leva em consideração o aumento das lentes microscópicas utilizadas, que neste estudo foram diferentes para estes dois parâmetros.

A detecção de células apoptóticas em cortes histológicos é possível pelas características morfológicas típicas das células em processo de morte celular (While et al., 1980). Técnicas mais refinadas têm sido desenvolvidas para o estudo de apoptose em cortes histológicos. Baseiam-se na marcação *in situ* de fragmentação de DNA (extremidades livres 3'-OH) que é uma característica das células apoptóticas (While et al., 1980; Gerschenson & Rotello, 1992; Majno & Joris, 1995) embora possa ser utilizada como marcador universal deste processo celular (Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992; Schulze-Osthoff et al., 1994). Uma destas, a ISEL (*in situ* end labelling), baseia-se na incorporação de nucleotídeos marcados no interior do DNA fragmentado, usando a DNA polimerase I ou seu fragmento de Klenow. A outra, chamada de TUNEL (TDT-mediated bio-dUTP nick end labelling) baseia-se na incorporação de dUTP marcados no interior do DNA fragmentado, usando a terminal deoxinucleotidil transferase (TDT) (Gravieli et al., 1992; Ansari et al., 1993; Negoescu et al., 1996). Comparações entre essas técnicas têm mostrado que o TUNEL é mais sensível que a ISL (Gold et al., 1994; Mundle & Raza, 1995). Este fato pode ser, em parte, devido à habilidade da TDT em marcar quebras de DNA em fitas simples e dupla, enquanto a DNA polimerase marca somente quebras de fitas simples (Negoescu et al., 1996; Mundle et al., 1995).

Os métodos de detecção de apoptose baseados na marcação *in situ* de fragmentação de DNA são de análise mais rápida, com custo mais elevado e o método baseado em padrões morfológicos é de mais fácil execução e mais barato. Entretanto, ambos apresentam alguns problemas potenciais.

Vários autores indicam que as técnicas ISEL e TUNEL podem marcar células apoptóticas e necróticas (Kressel & Groscurth, 1994; Grausl-Kraupp et al., 1995; De Torres et al., 1997), inclusive na placenta (Yasuda et al., 1995) ou mesmo, incluir a marcação de núcleos de células com morfologia não apoptótica (Gravieli et al., 1992; Ansari et al., 1993; Gold et al., 1994). Estes fatos indicam que estas técnicas podem marcar núcleos de forma inespecífica ou núcleos de células em estágio inicial de apoptose (Gold et al., 1994; Negoescu et al., 1996). Desta forma, a literatura chama a atenção da necessidade de cautela na interpretação e análise da morfologia das células marcadas pelos métodos de ISL e TUNEL (Ansari et al., 1993; Gold et al., 1993; Wijmann et al., 1993). Isto tem levado alguns autores a adaptar a microscopia eletrônica para confirmar quais células não apoptóticas são marcadas por esses métodos (Migheli et al., 1995; Sanders & Wride 1996). Outros autores, que estudaram a apoptose em placenta, também sugerem a utilização da microscopia eletrônica ao invés da utilização da técnica de TUNEL (Smith et al., 1997<sup>a</sup>; Smith et al., 1999; Smith et al., 2000).

Chan et al. (1999) salientam que o HE detecta apoptose, entretanto, o TUNEL é mais sensível para demonstrar apoptose pela sua habilidade em detectar as alterações bioquímicas iniciais que ocorrem nas células apoptóticas antes que se manifestem as

alterações morfológicas. Para validar a técnica do TUNEL, os autores repetiram as determinações em 14 lâminas sucessivas coradas com HE para identificar as características de apoptose no núcleo. O coeficiente de correlação de Spearman entre elas foi de 0,69 ( $p = 0,006$ ) porém o valor médio do HE foi 0,79% do encontrado com a técnica do TUNEL.

É importante salientar que na análise de apoptose pelos métodos de detecção *in situ* de fragmentação de DNA os processos de fixação (tipo e tempo de fixação), tratamentos prévios (enzimático e com microondas) e procedimentos da própria técnica podem influenciar nos resultados, isto é, na geração de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Alguns exemplos mostram que o tratamento breve dos cortes histológicos com tripsina ou pepsina marca poucas células apoptóticas, enquanto o tratamento prolongado com estas enzimas marca núcleos não apoptóticos (Ansari et al., 1993, Migheli et al., 1994). O tratamento dos cortes histológicos com microondas (tampão citrato pH 6,0) aumenta a detecção de células marcadas e/ou com morfologia não apoptótica (Sträter et al., 1995; Negoescu et al., 1996; Labat-Moleur et al., 1998).

Em nosso processamento dos cortes histológicos pela técnica do TUNEL, submetemos as lâminas histológicas ao tratamento com microondas em tampão citrato pH = 6. Como observado na Fig. 2B, muitos núcleos com morfologia não apoptótica foram marcados. Este fato, associado aos altos índices de detecção quando comparado ao método em HE, pode deixar dúvidas com relação a confiabilidade dos resultados obtidos como comentado acima.

Os índices de células apoptóticas analisadas pelo critério morfológico foram menores que os dos métodos de detecção *in situ* de fragmentação de DNA (Wheeldon et al., 1995; Soini et al., 1998); o mesmo foi observado na quantificação de apoptose em placenta humana (Smith et al., 1997<sup>a,b</sup>; Chan et al., 1999). Entretanto, os resultados obtidos com a análise baseada na morfologia tem mostrado boa correlação com estes métodos “DNA end labeling” (Wheeldon et al., 1995; Hawkins et al., 1997). Assim, o critério morfológico embora menos sensível, é um método barato para a detecção de apoptose.

Observamos taxas de células apoptóticas maiores em até 47 vezes, pelo método do TUNEL quando comparado ao método morfológico. Estes resultados podem decorrer de problemas de marcação falso-positiva da própria técnica ou porque, o método de TUNEL detecta fases iniciais de apoptose quando a célula ainda não apresenta sinais morfológicos de apoptose. De fato, a duração média é de 12 a 24 horas do processo de morte celular por apoptose depende do estímulo e do tipo celular (Leist & Nicotera, 1997). As alterações visíveis na morfologia da célula em apoptose são observadas de duas a quatro horas dentro do processo de apoptose e estão associadas à fase de degradação (Bursch et al., 1990; Leist & Nicotera, 1997). Isto pode, em parte, explicar a detecção menor de células em apoptose quando se usa a morfologia celular.

Os métodos baseados na observação morfológica também apresentam alguns problemas potenciais. A análise de apoptose na microscopia de luz convencional é subjetiva, consome muito tempo

e requer interpretação correta para distinguir células em apoptose de células em metáfase ou de neutrófilos (Wheeldon et al., 1995). Embora a utilização da microscopia eletrônica (ME) seja bem aceita para identificação de apoptose, este método também é laborioso e requer o processamento de grande número de amostras em virtude da quantidade pequena da amostra requerida pela ME (Smith et al., 1997; 2000).

Poucos são os dados de avaliação de proliferação celular na placenta durante diferentes períodos da gravidez normal ou com RCIU. Chan et al. (1999) encontraram correlação negativa entre proliferação celular e idade gestacional em placentas humanas durante o primeiro trimestre de gravidez. Nesse trabalho, a visualização de células Ki-67 positivas foi confinada às células sinciciotrofoblásticas e estromais. Nossos dados indicam que a proliferação celular nas placentas de ratas do grupo controle não se alterou entre o 18° e 21° de prenhez. Entretanto as placentas de ratas com diabetes grave, no final de prenhez, apresentam também níveis menores de atividade proliferativa quando comparado a amostras de placentas de ratas normais.

Chan et al. (1999) encontraram coeficiente de correlação de Spearman inverso significativo entre os índices de proliferação celular e apoptose em placentas de gestantes normais. No 18° dia de prenhez de ratas controle o coeficiente de correlação de Spearman foi inverso, porém, não significativo. Esses dados sugerem remodelação tecidual placentária no grupo controle.

Nas ratas diabéticas não houve correlação entre proliferação celular e apoptose. A hiperglicemia materna deve ter alterado o

tecido placentário. Mais pesquisas devem ser feitas para dar continuidade neste trabalho:

1) Estudar os níveis de proliferação celular e apoptose em placentas de ratas normais e diabéticas de 7, 14, e 21 dias de prenhez, para estabelecer correlações entre as alterações de cinética celular ao longo de períodos bem distintos da prenhez.

2) Estudar a expressão da caspase3 na placenta de ratas normais e diabéticas para caracterizar a dependência de ativação da via das caspases na morte de células placentárias;

3) Estabelecer a relação entre hiperglicemia e diminuição de apoptose e proliferação celular em placentas de ratas diabéticas no 21º dia de prenhez, estudando enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e à expressão de proteínas de controle da proliferação celular e apoptose;

Em conclusão, podemos relatar que a análise da apoptose pelo TUNEL, com índices apresentados por área de tecido placentário, parece ser mais adequada que o HE, pela rapidez na leitura das lâminas e conseqüente eficiência comprovada neste trabalho; os índices de PCNA e apoptose placentários por campo e por mm<sup>2</sup>, foram menores nos grupos diabéticos no 21º dia da prenhez. No 18º dia, estas análises foram equivalentes nos grupos controle e diabético; os índices de PCNA e apoptose não se correlacionaram, tanto no 18º como no 21º dia, nos grupos controle ou diabético.

**Agradecimentos:** A Capes, por ter financiado este trabalho, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização.

## REFERÊNCIAS

- Amato P., Zwain I., Reed J. & Yen S.S.C. (1996). Expression of Bcl-2 and Bax in human placenta. J. Soc. Gynecol. Invest. 3 (suppl), 226A.
- Ansari B., Coates P.J., Greenstein B.D. & Hall P.A. (1993). *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. J. Pathol. 170,1–8.
- Bravo R., Frank R., Blundell P.A. & Macdonald-Bravo H. (1987) . Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . Nature 326, 515–517.
- Bursch W., Paffe S., Putz B., Barthel G. & Schulte-Herman R. (1990). Determination on the length of the histological state in normal liver and the altered hepatic foci of rats. Carcinogenesis 11, 847–853.
- Calderon I.M.P., Rudge M.V.C., Brasil M.A.M. & Henry M.A.C.A. (1992) Diabetes e gravidez experimental em ratas: indução do diabetes, obtenção e evolução da prenhez. Acta Cir. Brasil 7 (4), 142–146.
- Calderon I.M.P., Rudge M.V.C., Ramos M.D. & Peraçoli J.C. (1999). Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico, de placenta de ratas diabéticas: relação com a macrosomia e o

retardo de crescimento intra-uterino. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 21(2), 91–98.

Calderon I.M.P. (1994). Influência do binômio diabete e gravidez na atividade endócrina do pâncreas materno e fetal. Estudo experimental em ratas. Universidade Estadual Paulista, 1994 (Tese).

Chan C.C., Lao T.T. & Cheung A.N. (1999). Apoptotic and proliferative activities in first trimester placenta. Placenta 20, 223–227.

Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Disndale D. & Skilleter D.N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. Biochem. J. 286, 331–334.

Collins M.K.L. & Lopez Rivas A. (1993). The control of apoptosis in mammalian cells. TIBS 18, 307–309.

Collins R.J., Harmon B.V., Gobe G.C. & Kerr J.F.R. (1992). Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. Int. Radiol. Biol. 61, 451–453.

Davies J. & Glasser S.R. (1968). Organization of normal placenta. Acta Anat. 69, 542–608.

- De Torres C., Munell F., Ferrer I., Reventos J. & Macaya A. (1997). Identification of necrotic cell death by TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Lett* 230, 1–4.
- Gerschenson L.E. & Rotello R.J. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb* 6, 2450–2455.
- Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschop H., Hartung H.P., Toyka K.V. & Lassman H. (1994). Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined used of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 71, 219–229.
- Gold R., Schmiied M., Rothe G., Zischler H., Bretschopf H. & Wekerle H., Lassmann H. (1993). Detection of DNA fragmentation in apoptosis, application of *in situ* translation to cell culture system and tissues sections. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1023–1030.
- Grausl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W. & Schult-Hermann R. (1995). *In situ* detecting fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepathology* 21, 1465–1468.
- Gravieli Y., Sherman Y. & Ben-Sasson S.A. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 493–501.

- Hawkins N.J, Lees J. & Ward R.L. (1997). Detection of apoptosis in colorectal carcinoma by light microscopy and *in situ* end labeling. Anal Quant. Cytol. Histol. 19, 227–232.
- Hsu S.M., Raine L. & Fanger N. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 557–80.
- Huppertz B., Frank H.G., Kingdom J., Korr H. & Kaufmann P. (1999) Apoptosis cascade progress during turnover trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. Lab. Invest. 79(12), 1687–1692.
- Kamil C.A, Khan S.A. & Moulton B.C. 1996. Effect of decidualization on the expression of Bax and Bcl-2 in the rat uterine endometrium. Endocrinol 137(7), 3123–3130.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. & Currier A.R. (1972). Apoptosis; a basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Canc. 26, 239–57.
- Kim C.J., Choe Y.J., Yoon B.H., Kim C.W. & Chi J.G. (1995). Patterns of Bcl-2 expression in the placenta. Pathol. Res. Pract. 191, 1239–1234.
- Kressel M. & Groscurth P. (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by *in situ* labeling of fragmented DNA. Cell Tissue Res. 278, 549–556.

Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E. & Negoescu A. (1998). TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46(3), 327–334.

Leist M. & Nicotera P. The space of cell death (breakthroughs and views). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 1–9.

Majno G. & Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrose. An review of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3–15.

Mayhew T.M., Leac L., McGee R., Ismail W.W., Myklebust R. & Lammiman M.J. (1999). Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation. *Placenta* 20, 407–422.

McCormick D. & Hall P.A. (1992). The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 21: 591–594.

Migheli A., Attanasio A. & Schiffer D. (1995). Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by *in situ* end labelling techniques. *J. Pathol.* 27–35.

Migheli A., Cavalla P., Marino, S. & Schieffer D. (1994). A study of apoptosis in normal and pathological nervous tissue after *in situ* end labeling of DNA strand breaks. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 606–616.

- Mor G., Gutierrez L.S., Eliza M., Kahyaoglu F. & Arici A. (1998). Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestacional trophoblastic disease. Am. J. Reprod. Immunol. 40, 89–94.
- Mundle S. & Raza A. (1995). The two *in situ* techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. Lab. Invest. 72, 611–613.
- Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Drouet C., Robert C., Guillermet C., Brambilla C. & Brambilla E. (1996). *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. J. Histochem. Cytochem. 44, 959–968.
- Nelson D.M. (1996). Apoptotic changes in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. Placenta 17, 387–391.
- Prelich G., Tan C.-K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey, K.M. & Stillman B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-  $\delta$  auxiliary protein. Nature 326, 517–520.
- Salafia C.M., Mill I.F., Ossandon M. & Starzyk K.A. (1996). Markers of regulation of apoptosis and cell proliferation in preterm and term placental villi. J. Soc. Gynecol. Invest. 3 (suppl), 80A.

Sander E.J. (1997). Methods for detecting apoptotic cell in tissue. *Histol. Histopath.* 12, 1169–1177.

Sanders E.J. & Wride M.A.(1996). Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.* 28, 275–281.

Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W. & Krammer P.H. (1994). Cell nucleos and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 127, 15–20.

Schwartzman R.A. & Cidlowski J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14,133–151.

Smith S.C., Baker P.N. & Symonds E.M. (1997<sup>a</sup>). Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Osbst. Gynecol.* 177(1), 57–65.

Smith S.C., Baker P.N. & Symonds E.M. (1997<sup>b</sup>). Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am. J. Osbst. Gynecol.* 177(6), 1395–1401.

Smith S.C., Baker P.N. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. (1999). *Brit. J. Obst. Gynecol.* 106, 861–862.

Smith S.C., Leung T.N., To K.F. & Baker P.N. (2000). Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 697–699.

Snedecor G.W., Cochran W.G. (1980). Statistical methods, 7 ed, Ames, Iowa State University; 505, 1980.

Soini Y., Pääkko P. & Lehto A. (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am. J. Pathol.153(4), 1041–1053.

Sträter J., Gunthert A.R. & Btuderlein S. (1995). Microwave irradiation or paraffin-embedded tissue sensitizes TUNEL method for *in situ* detection of apoptotic cells. Histochemistry, 103, 157–160.

Waddell B.J., Hisheh S., Hisheh S., Dharmarajan A.M. & Burton P.J. (2000). Apoptosis in the rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. Biology of Reproduction 63(6), 1913–1917.

Wheeldon E.B., Williams S.M., Soames A.R., James N.H. & Roberts R.A. (1995). Quantitation of apoptotic bodies in rat liver by *in situ* end labelling (ISEL): correlation with morphology. Toxicologic. Pathol. 3, 410–415.

Wijmann J.H., Jonker R.R., Keizer, Van Dierendonck J.H, Cornelisse C.J. & Van Dierendonck J.H. (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin section, *in situ* end- labeling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem. 41, 7–12.

Wyllie A.H. & Duvall E. (1992). Cell injury and death. In: McGee J.O.D., Isaacson P.G., Wright N.A., eds. Oxford textbook of pathology. Oxford: Oxford University Press 141–147.

Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currier A.R. (1980). Cell death, the significance of apoptosis. *Int. Ver. Cytol.* 68, 251–306.

Yasuda M., Unemura S., Osamura Y., Kenjo T. & Tsutsumi Y. (1995). Apoptotic cell in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch. Histol. Citol.* 58, 185–190.

Zar, JR. (1984). *Bioestatistical analysis*, 2nd ed Englewood Cliffs: Prentice Hall, 718.

## **Artigo Original II\***

### **Evolução dos índices de proliferação celular e apoptose em placentas de ratas com diabetes grave: relação com a glicemia materna e o resultado perinatal**

---

\* Padronizado de acordo com as normas de publicação da Revista Placenta

## RESUMO

O diabetes grave em ratas é modelo de RCIU. A literatura relata relação entre RCIU e aumento de apoptose na placenta, mas não há relatos sobre apoptose e proliferação celular em placentas de ratas diabéticas. O objetivo foi analisar os índices de proliferação celular e de apoptose no 18º e 21º dias de prenhez de ratas diabéticas em relação aos níveis glicêmicos maternos e ao resultado perinatal. Foram colhidas 100 placentas de 20 ratas Wistar divididas em quatro grupos experimentais: controle e diabético de 18 e 21 dias. Analisou-se a proliferação celular pelo método do PCNA e a apoptose pelo método do TUNEL que foram correlacionados com a média glicêmica materna e o peso dos recém-nascidos. Os resultados evidenciam que os índices de proliferação celular e apoptose foram menores nas placentas de ratas diabéticas de 21 dias e diminuíram do 18º para o 21º dia, porém, não houve diferença entre esses índices nas placentas de RN-PIP e N-PIP dos grupos controle e diabéticos. Ambos índices não se correlacionaram com o peso do recém-nascido e com a média glicêmica materna.

Palavras-chave: diabetes; proliferação celular; apoptose; placenta; ratas.

## SUMMARY

The serious diabetes in rats is a model of IUGR (inter-uterine growth restriction). The literature relates the relationship between IUGR and the increase of apoptosis in the placenta, but there are no reports about apoptosis and cell proliferation in diabetic rats. The aim of this project was to analyze the proliferation and apoptosis indexes on the 18<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of diabetic rats pregnancy related to maternal glycemia mean and perinatal results. There were collected 100 placentae from 20 Wistar rats, divided into four experimental groups: 18 and 21 days control and diabetics. Cell proliferation was analyzed by the PCNA's method and apoptosis by TUNEL's method. These indexes were related to maternal glycemia mean and newborn weight. Our results suggest that the cell proliferation and apoptosis indexes were smaller in diabetic rats placentae of 21 days and the reducing time period was from 18<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> days. So, there was no difference among placentae indexes of small newborns and non small ones for pregnancy age in control and diabetic groups. Both indexes were unrelated to the newborn weight and the average of maternal glycemia.

Key words: diabetes; cell proliferation; apoptosis; placenta; rats.

## INTRODUÇÃO

A apoptose e a proliferação celular são processos fisiológicos importantes que, em conjunto, mantêm a homeostasia tecidual (Chan et al., 1999). A mitose é o método usual de proliferação celular; a apoptose e a necrose são as principais formas de morte celular.

A apoptose é evidenciada por alterações morfológicas e bioquímicas na microscopia eletrônica, caracterizadas por membranas cheias de bolhas, retração celular, condensação citoplasmática e cromatínica e marginalização da cromatina condensada (Schwartzman & Cidlowski, 1993). A alteração bioquímica é a fragmentação do DNA, mediada por indutores ou bloqueadores intracelulares; pode ser confirmada por várias técnicas laboratoriais, que identificam eventos de clivagem no núcleo e no citoplasma (Mayhew, 2001).

A placenta é um órgão onde o processo de apoptose ocorre desde os momentos iniciais do desenvolvimento do ovo (Pampfer, 2000), no início da gestação (Chan et al., 1999; Kudo et al., 2000) e até o segundo e terceiro trimestres (Kudo et al., 2000; Smith et al., 1997<sup>a</sup>). Foi descrita no sincício e no citotrofoblasto (Crocker et al., 2001) e observada, também, nos casos de restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) (Smith et al., 1997<sup>b</sup>; Kudo et al., 2000; Levy et al., 2002), no aborto retido, nas gestações com aberrações cromossômicas (Halperin et al., 2000) e nas placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (Allaire et al., 2000) ou

tabagistas (Levy et al., 2002). Paschoini (2002) verificou a presença de apoptose em 36% das placentas de gestantes com síndromes hipertensivas. Kudo et al. (2000) encontraram 9,7% de células apoptóticas em placentas com RCIU, índice maior que nas provenientes de fetos com peso adequado para idade gestacional.

Chan et al. (1999) salientaram que a apoptose é descrita durante toda a gestação e que seu aparecimento concomitante com a proliferação celular reflete o crescimento e a remodelação da placenta, mantendo a homeostasia tecidual. Kudo et al. (2000) verificaram que, nos casos de RCIU, a telomerase estava ausente, indicando a falta de proliferação celular. Observaram, ainda, aumento de apoptose pela técnica do TUNEL e diminuição das células não-apoptóticas pelo uso do anticorpo monoclonal Bcl-2. Levy et al. (2002) correlacionaram o aumento da apoptose no vilos corial de gestações complicadas por RCIU com a super-regulação da expressão da proteína pró-apoptótica p53. Os autores discutem que as condições clínicas predisponentes da hipóxia placentária aumentam a apoptose mediada pela p53 no trofoblasto e, desse modo, contribuem para a disfunção placentária.

O diabetes grave em ratas é modelo de RCIU (Calderon et al., 1992; Calderon et al., 1999; Rudge et al., 1998; Consonni, 1999; Volpato, 2001, Damasceno et al., 2002; Almeida, 2002) associado ao maior peso da placenta e do índice placentário. O exame histopatológico evidenciou espessamento da membrana onde ocorrem as trocas materno-fetais (Calderon et al., 1992). A RCIU foi identificada a partir do 18º dia de prenhez nas ratas com diabetes grave, época em que o índice placentário já mostrava disfunção do

órgão. No 18º dia as placentas das ratas controle e diabéticas exibiam reação de PAS positiva, ou seja, o glicogênio estava presente; no 21º dia as placentas do grupo controle apresentavam reação de PAS negativa, e no diabetes grave, essa reação era fortemente positiva. Tais resultados evidenciaram que o glicogênio permanece na placenta de ratas com diabetes grave e os seus fetos têm RCIU. Estudos com microscopia eletrônica confirmaram depósito de glicogênio na superfície placentária em ratas diabéticas, sugerindo imaturidade do órgão (Gewolb et al.,1986).

As células do nó embrionário dependem do transporte de substâncias pelo trofoectoderma e da sua função de síntese, bem como do número de características proliferativas e diferenciadas, tornando essa população de células sensível a inúmeros agentes citotóxicos. O quanto essas diferenças celulares e moleculares induzidas no nó embrionário influenciam o desenvolvimento do trofoblasto é uma questão que recebeu pouca atenção (Pampfer, 2000).

Há evidências experimentais de que, após a implantação, a lesão seletiva da hiperglicemia no nó embrionário do blastocisto de rata estende-se para o trofoectoderma (Pampfer & Hertogh, 1996). Blastocistos de ratas com diabetes induzido têm o nó embrionário muito desorganizado, com proporção anormal de células trofoblásticas gigantes. Estas alterações peri-implantação predizem anomalias ultra-estruturais, características da placenta diabética, e merecem maiores investigações (Pampfer, 2000).

A síntese de DNA placentário em ratas diabéticas continua até o 18º e 19º dias de prenhez, dois a três dias além da

estabilização do DNA total nas placentas de ratas não-diabéticas (Gewolb et al., 1983). À microscopia óptica, o espessamento de membrana nas regiões de trocas materno-fetais e a presença de células trofoblásticas remanescentes nas placentas de ratas diabéticas denotam imaturidade, ou seja, um órgão menos eficiente para garantir o desenvolvimento fetal (Calderon et al., 1992). Além da produção contínua de DNA, a síntese de RNA e proteínas foi mantida até o final da prenhez, ou seja, a hiperplasia e a hipertrofia celular, associadas a manutenção de glicogênio no 21º dia, tornaram a superfície de troca materno-fetal mais espessa e prejudicaram o desenvolvimento do feto. Em decorrência destas alterações, houve diminuição acentuada dos recém-nascidos de peso adequado e manifestou-se a RCIU (Calderon et al., 1999). Esses achados indicaram que, no diabete grave, a hiperglicemia materna alterou a maturação da placenta, caracterizando-a como insuficiente em sua função nutritiva, pela maior incidência de recém-nascidos pequenos para a idade de prenhez (PIP).

Os conhecimentos atuais indicam maior frequência de apoptose em placentas de fetos com RCIU (Smith et al., 1997<sup>b</sup>; Kudo et al., 2000; Levy et al., 2002). O aumento da espessura placentária e do conteúdo de DNA e proteínas permitem a ilação de que placentas de ratas com diabete grave devam ter maior índice de proliferação celular. Entretanto, como o diabete grave em ratas é modelo de RCIU (Calderon, 1998; Calderon et al., 1999; Rudge et al., 1998; Consonni, 1999; Damasceno et al., 2002; Volpato, 2001; Almeida, 2002), fica difícil entender que mecanismos antagônicos – apoptose e proliferação celular (Chan et al., 1999; kudo et al., 2000;

Levy et al., 2002), – possam coexistir nessas placentas de ratas portadoras de diabetes grave na mesma intensidade. Tais questionamentos e a falta de dados na literatura sobre apoptose e proliferação celular, avaliados de modo concomitante em placentas (Chan et al., 1999; kudo et al., 2000; Levy et al., 2002), levaram ao delineamento deste trabalho. A análise quantitativa destes índices e de sua evolução entre o 18º e 21º dias de prenhez de ratas diabéticas deverá fornecer subsídios para melhor entendimento da fisiopatologia do RCIU em ratas com diabetes grave. O objetivo geral deste trabalho foi analisar os índices de proliferação celular e de apoptose no 18º e no 21º dias de prenhez em placentas de ratas com diabetes grave, relacionados aos níveis glicêmicos maternos e ao resultado perinatal. Os objetivos específicos foram: descrever a evolução dos índices médios de proliferação celular e de apoptose do 18º ao 21º dias de prenhez em placentas de ratas normoglicêmicas e com diabetes grave; comparar os índices de proliferação celular e de apoptose no 18º e no 21º dias de prenhez em placentas de ratas normoglicêmicas e com diabetes grave, relacionados à proporção de recém-nascidos de pesos pequenos (PIP) ou não (NPIP) para a idade de prenhez e correlacionar os índices de proliferação celular e de apoptose no 18º e no 21º dias de prenhez em placentas de ratas normoglicêmicas e com diabetes grave com o peso dos recém-nascidos e a média glicêmica materna.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi um trabalho experimental e prospectivo, utilizando ratas da raça Wistar em idade reprodutiva. Vinte ratas foram distribuídas de maneira aleatória, em quatro grupos experimentais, de acordo com a presença ou não do diabetes e com o momento da resolução da prenhez (18 e 21 dias):

G1 – Grupo controle 18 dias – cinco ratas;

G2 – Grupo controle 21 dias – cinco ratas;

G3 – Grupo diabético 18 dias – cinco ratas e

G4 – Grupo diabético 21 dias – cinco ratas.

Foram colhidas 100 placentas das 20 ratas que foram coradas por duas técnicas (n = 200 lâminas) para determinação dos índices de proliferação celular e apoptose (Figura 1).

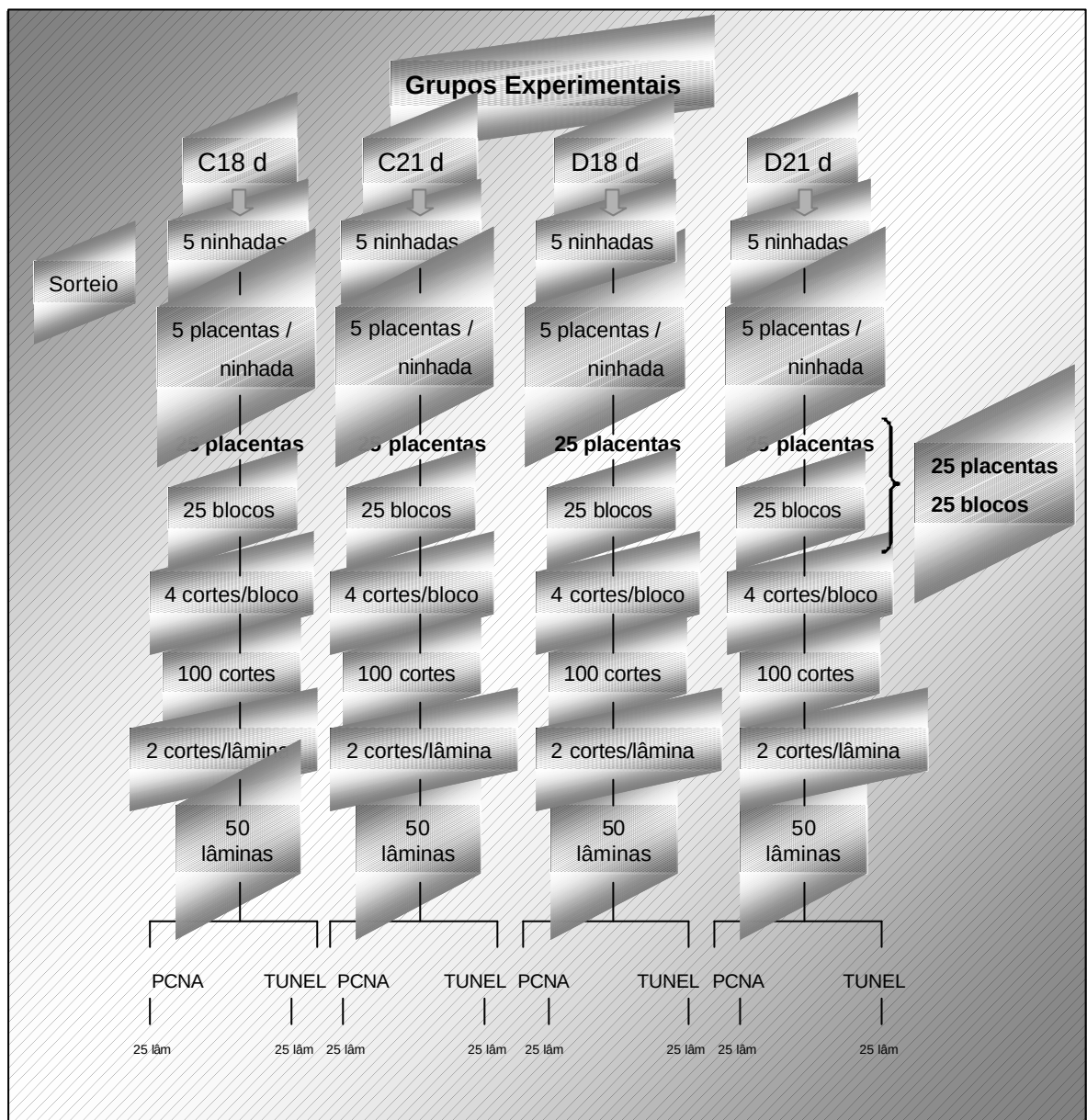


**Figura 1.** Representação esquemática dos procedimentos para estudo histológico de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL).

### 1. *Seqüência experimental*

Para a constituição dos grupos, os animais foram introduzidos na seqüência experimental do modelo de diabete e prenhez, padronizado por Calderon et al. (1992), caracterizado por quatro períodos: adaptação, diabetogênico, acasalamento e prenhez.

Independentemente do grupo, as ratas foram adaptadas às condições do laboratório por sete dias. A seguir, as sorteadas para os grupos diabéticos receberam streptozotocin (Sigma Chemical CO, ST. Louis, MO, EUA), 40 mg/kg/peso, por via intravenosa. As ratas dos grupos controles receberam solução salina NaCL a 0,9% em volume equivalente à droga diabetogênica. O diabete grave foi confirmado no 7º dia do período diabetogênico, para limites de glicemia iguais ou superiores a 200 mg/dL. A seguir, todas as ratas (controle e diabéticas) foram iniciadas no período de acasalamento noturno, na proporção de um macho para quatro fêmeas, durante 15 dias. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal matinal, associada a características citológicas de fase de estro, sendo este considerado o dia zero da prenhez.

Durante a prenhez, além da observação diária dos animais, os níveis glicêmicos maternos foram avaliados a cada sete dias, desde o início até o 18º ou 21º dias. No dia da resolução da prenhez as ratas foram anestesiadas por inalação de éter etílico, e submetidas à laparotomia e histerotomia, quando as placentas e os fetos foram, imediatamente, retirados e pesados. As mães, após este procedimento, foram mortas por esgotamento da volemia (Calderon et al., 1992).

## 2. Variáveis e Técnicas

### 2.1. Peso e classificação dos recém-nascidos e placentas

Após a laparotomia e histerotomia, os recém-nascidos foram separados das placentas e pesados individualmente, utilizando-se balança Marte (Brasil) com capacidade de 500g e precisão de 0,001g. Seus pesos corpóreos foram classificados, em relação ao peso corpóreo fetal do grupo controle, em três grupos (Calderon et al.,1992):

AIP – recém-nascidos com peso adequado para idade de prenhez: peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos um desvio-padrão;

PIP – recém-nascidos pequenos para a idade de prenhez: peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos um desvio-padrão;

GIP – recém-nascidos grandes para a idade de prenhez: peso corpóreo superior à média de peso do grupo controle mais um desvio-padrão.

Os recém-nascidos AIP e GIP foram agrupados e identificados como não-PIP (N-PIP).

As placentas também foram pesadas individualmente e o índice placentário (IP) foi determinado pela relação entre o peso placentário (PP) e o peso fetal (PF) (Calderon, 1992):

$$IP = \frac{\text{Peso da placenta}}{\text{Peso fetal}}$$

## 2.2. Glicemia materna e média glicêmica da prenhez

Os níveis séricos de glicemia foram monitorados por leitura de glicofita (Blood Glucose Monitoring Test Strips Ultra +, HDI Home Diagnostics, Inc, Flórida, EUA), em sangue obtido por punção da parte distal da cauda da rata. Esta fita foi introduzida em glicosímetro específico, expressando os valores da glicemia em miligramas por decilitro (mg/dL). As dosagens foram realizadas no zero, sétimo, 14º e 18º ou 21º dias da prenhez. Considerou-se média glicêmica da prenhez (MG) a média aritmética, obtida pela somatória de todas as glicemias avaliadas, dividida pelo total delas (quatro).

$$MG = \frac{\Sigma \text{glicemias}}{\text{Total de glicemias}}$$

## 2.3. Procedimentos para estudo histológico das placentas

Após a retirada dos fetos e placentas, foram sorteados cinco fetos e cinco placentas para cada grupo experimental, que foram pesados individualmente e as placentas cortadas transversalmente na região labiríntica (Davies & Glasser, 1968), sendo que a região do cordão umbilical foi desprezada. A seguir, os cortes foram fixados em formalina tamponada à 10% por 24 horas. Esses fragmentos placentários foram lavados em água corrente, onde permaneceram por 24 horas. Após este período, esse material foi aparado e colocado em cassetes plásticos identificados e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

Após a retirada do álcool 70%, os fragmentos placentários foram desidratados em banhos sucessivos de álcool a 85%, álcool a 95% e álcool absoluto (três vezes) por uma hora cada. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III por uma hora cada reagente. Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina a 60°C.

#### *2.4. Determinação, na placenta, dos índices de proliferação celular pela reação de imuno-histoquímica para PCNA e de apoptose pelo do método de TUNEL*

Cortes histológicos de placenta de 7 µm de espessura foram colocados sobre lâminas histológicas identificadas e pré-tratadas com solução de poly-D-lisina (SIGMA Chemical CO, MO, EUA). As lâminas foram, levadas à estufa (Famen 002C- Brasil) à 60°C por 12 horas e, posteriormente, passaram pelos seguintes procedimentos:

- a) Desparafinização: em três de banhos de xilol por 10 minutos cada;
- b) Hidratação: realizada pela passagem do material por 3 banhos sucessivos em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% e água destilada.

Após estas etapas, o processamento se diferenciou conforme a técnica empregada.

#### 2.4.1. *Índice de proliferação celular pela reação de imuno-histoquímica para PCNA\**

O PCNA, antígeno nuclear de células proliferativas, específico para ratos, é uma proteína acídica e não histônica de 36 kDa que atua como um co-fator da DNA polimerase  $\delta$ , importante para o processo de síntese de DNA (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987; McCormick & Hall, 1992).

A expressão do antígeno nuclear de proliferação nuclear (PCNA) foi avaliada pela técnica imuno-histoquímica do complexo Avidina-Biotina (ABC) (Hsu et al., 1981).

As lâminas já desparafinizadas e hidratadas, passaram pelos seguintes procedimentos:

- a) Bloqueio da peroxidase endógena: incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à 3% em álcool metílico, durante 10 minutos;
- b) Bloqueio de ligações inespecíficas: mergulho das lâminas em solução de soro normal de equino por, no mínimo, 20 minutos;
- c) Incubação com anticorpo primário: aplicação em cada corte histológico de 100 a 200  $\mu$ l de anticorpo primário monoclonal anti-PCNA (Novocastra, EUA) que foram mantidos em bandeja de imuno-histoquímica (Shandon, EUA) em sistema de câmara úmida na geladeira à 4°C por 12 horas;
- d) Incubação com anticorpo secundário (Novocastra, EUA): aplicação em cada corte histológico de 100 a 200  $\mu$ l anti-IgG universal (1:200 em ABS à 1%) para as reações de PCNA, incubado, por uma hora, à temperatura ambiente;

---

\* Foram utilizados kits de imuno-histoquímica para PCNA (Novocastra, EUA).

- e) Reagente ABC (Novocastra, EUA): a preparação foi feita adicionando gotas de solução A (avidina) e de solução B (biotina conjugada com peroxidase) em 5 ml de PBS. A solução permaneceu em repouso por 30 min, antes de ser aplicada, na dose de 100 a 200  $\mu$ l/ lâmina. As lâminas foram submetidas à incubação por 45 minutos, à temperatura ambiente;
- f) Incubação com solução de 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (Sigma Chemical CO, MO, EUA): o preparo da solução foi feito colocando-se 3,75 mg de DAB em 10 ml de tampão Tris-HCl (pH = 7,4) e adicionando 2,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%. A mistura dos componentes desta solução foi feita, obrigatoriamente, na seqüência em que aparece no texto e imediatamente antes do uso. Foram aplicados de 100 a 200  $\mu$ l/lâmina da solução DAB ativada em cada lâmina histológica por 4 minutos, à temperatura ambiente;
- g) Contra-coloração: as lâminas foram colocadas em cuba com hematoxilina de Harris à 50%, permanecendo por 1 minuto, lavagem em água corrente, em seguida, a passagem das lâminas em água amoniacal e, nova lavagem em água corrente. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% (três vezes), e por passagem em xilol (três vezes). Posteriormente, foi feita a montagem das lâminas com lamínula (24 × 32 mm) em resina sintética Permount (Fisher, EUA).

A partir da hidratação e com exceção do item b, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos cada em solução de PBS 0,1M (solução fosfato tamponada, pH = 7,2). Entre as etapas

o excesso da solução foi retirado com um compressor-aspirador (Neuomi MB, Brasil).

Todas as células PCNA positivas foram contadas em cinco campos microscópicos semi-sucessivos de placentas de ratas dos grupos controle e diabético, usando-se microscópio Leica DMLB (Alemanha) na objetiva de 40× com a utilização de gradícula.

O índice médio de células em proliferação celular por mm<sup>2</sup> foi calculado pelo número total das células PCNA positivas encontradas nos cinco campos mensurados, dividida pela área circular em mm<sup>2</sup>.

$$I_{\text{Proliferação}} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área circular em mm}^2} (\text{mm}^2)$$

#### 2.4.2. Índice de apoptose na placenta pelo método de TUNEL\*

A técnica do TUNEL (terminal deoxynucleodity transferase – mediated d UTP nick end-labeling) tem habilidade para detectar as alterações bioquímicas iniciais que ocorrem nas células apoptóticas antes que se manifestem as alterações morfológicas (Chan et al., 1999). A identificação de células em apoptose na placenta pelo método de TUNEL foi feita pela visibilização de núcleos com marcação positiva, corados em marrom pela reação de DAB. Todas as células apoptóticas foram contadas em 25 campos microscópicos semi-sucessivos das placentas de ratas dos grupos controle e diabético,

---

\* Foram utilizados kits de apoptose para avaliação do TUNEL (Oncogene, EUA).

utilizando-se microscópio Axiophot (Alemanha) na objetiva de 40× e optovar de 2×.

As lâminas já desparafinizadas e hidratadas, passaram pelos seguintes procedimentos:

- a) As lâminas com cortes histológicos foram colocadas em cuba com tampão citrato (pH = 6) e levadas ao forno de microondas (CCE, Brasil) por 10 minutos (dois ciclos de 5 minutos cada) na potência máxima de 1300 W. Após este procedimento, as lâminas permaneceram no forno de microondas por mais 20 minutos à temperatura ambiente;
- b) Permeabilização dos cortes histológicos: aplicação nas lâminas de 100 µl de proteinase K (2mg/ml) em tampão Tris10mM (pH = 8) durante 20 minutos à temperatura ambiente;
- c) Estabilização para a reação de marcação pela diluição do tampão de equilíbrio 1:5 em água destilada: cada lâmina recebeu 100µl dessa diluição, durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- d) Reação de marcação com 3 µl da enzima TdT mais 57 µl da mistura da reação de marcação (TdT): cada lâmina recebeu 60 µl dessa diluição, durante 1 hora e meia à temperatura de 37°C;
- e) Finalização da reação de marcação: cada lâmina recebeu 100 µl de tampão de parada de reação, durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- f) Inativação de peroxidase endógena pela imersão das lâminas durante 5 minutos na solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 1:10 em metanol;

- g) Detecção da reação: cada lâmina recebeu 100  $\mu$ l de tampão de bloqueio durante 10 minutos à temperatura ambiente, e também 100  $\mu$ l do conjugado (50 vezes) diluído 1:50 em tampão de bloqueio, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, um tablete de DAB e um tablete de água oxigenada/uréia, foram dissolvidos em 1 ml de água: cada lâmina recebeu 100  $\mu$ l dessa diluição, durante 10 minutos à temperatura ambiente;
- h) Contra-coloração: as lâminas foram colocadas em uma cuba com hematoxilina de Harris à 50%, permanecendo por um minuto; foi feita a lavagem em água corrente, em seguida a passagem da lâminas em água amoniacal e, novamente, a lavagem em água corrente. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% (três vezes), e por passagem em xilol (três vezes). Posteriormente, foi feita a montagem das lâminas com lâminula (24  $\times$  32 mm) em resina sintética Permout.

A partir da hidratação, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão Tris-NaCl (pH = 7,4). Entre as etapas, o excesso da solução foi retirado com o compressor aspirador (Neuoni MB, Brasil). Uma lâmina de controle positivo de apoptose, fornecida pelo fabricante, foi incluída nas reações (células HL60 de leucemia promielocítica tratadas com 0,5  $\mu$ g/ml de actinomicina D).

O índice médio de apoptose por mm<sup>2</sup> foi calculado pelo número total das células apoptóticas encontradas em 25 campos mensurados, divididas pela área circular em mm<sup>2</sup>.

$$I_{\text{Apoptose}} = \frac{\text{Nº total de células contadas}}{\text{Área circular em mm}^2} (\text{mm}^2)$$

### 3. *Análise estatística*

Os dados relativos à glicemia materna, pesos dos recém-nascidos e das placentas, índices placentários, de proliferação celular, de apoptose e de PIP e N-PIP foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (Zar,1984). Para o cálculo das correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (Snedecor e Cochran, 1980) entre os índices de proliferação celular (PCNA) e de apoptose (TUNEL) com o pesos do recém-nascidos e a média glicêmica da prenhez. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

### 4. *Aspectos éticos*

O projeto foi desenvolvido dentro dos preceitos éticos recomendados em experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, aos 29 de outubro de 2001 (Anexo 1).

## RESULTADOS

As ratas diabéticas apresentaram valores médios de glicemia significativamente maiores que os das ratas controle, em todos os períodos analisados (Figura 2).

Os pesos dos recém-nascidos de ratas diabéticas foram menores, as placentas apresentaram peso médio maior e os índices placentários médios foram maiores que os de ratas controle no 18° e 21° dias (Tabela 1).

Os índices de proliferação celular (PCNA) e de apoptose (TUNEL) mantiveram-se inalterados do 18° até o 21° dias de prenhez nas ratas do grupo controle. Nas ratas diabéticas houve diminuição de ambos os índices do 18° ao 21° dias de prenhez. (Figura 3).

A porcentagem de recém-nascidos PIP foi maior no 18° (64%) e no 21° dias (100%) nas ratas diabéticas. No 21° dia de prenhez de ratas diabéticas todos os recém-nascidos foram PIP (Tabela 2).

Os índices de proliferação celular e de apoptose foram menores nas placentas de recém-nascidos com peso pequeno para a idade de prenhez no grupo de ratas diabéticas de 21 dias quando comparado com os de ratas controle de 21 diabéticas de 18 e controle de 18 dias de prenhez. Não houve diferença estatística entre os índices de proliferação celular e apoptose nas placentas de recém-nascidos de padrão PIP e N-PIP dentro do mesmo grupo experimental, para ratas controle de 18 e 21 dias e diabéticas de 18 dias (Tabela 2).

O coeficiente de correlação de Spearman entre PCNA e TUNEL no grupo controle de 18 dias foi  $-0,29$  e no de 21 dias  $0,22$ ; no grupo diabético de 18 dias foi de  $0,21$  e no de 21 dias  $-0,02$  (Figura 4).

Os coeficientes de correlação de Spearman entre os índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) com o peso dos recém-nascidos e com a média glicêmica da prenhez, nos quatro grupos não foram significativos (Tabela 3).

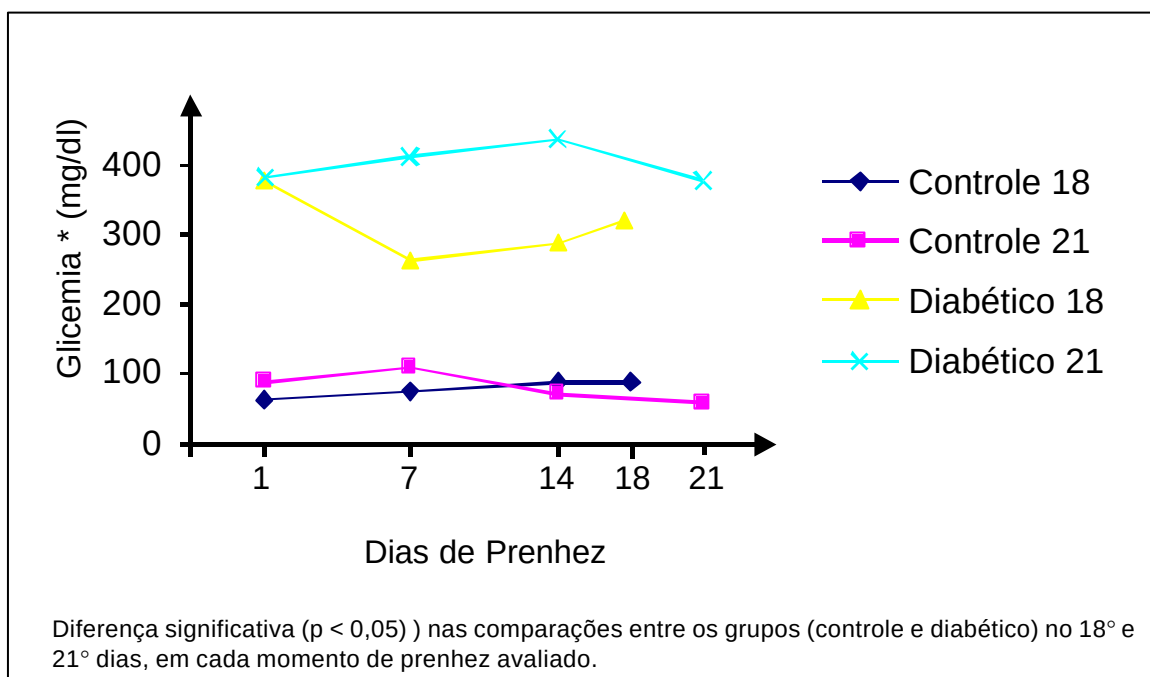


**Figura 2.** Evolução das glicemias maternas (mg/dL) nas ratas dos grupos controle e com diabetes grave de 18 e 21 dias.

**Tabela 1.** Média e desvio-padrão de pesos (g) dos recém-nascidos (RN), das placentas (g) e dos índices placentários (IP) nas ratas dos grupos controle e com diabetes grave no 18° e 21° dias de prenhez.

|               | Controle                 |                           | Diabete                  |                           |
|---------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|               | 18°                      | 21°                       | 18°                      | 21°                       |
| Peso RN*      | 1,52 ± 0,17 <sup>a</sup> | 4,82 ± 0,32 <sup>a1</sup> | 1,24 ± 0,21 <sup>b</sup> | 3,47 ± 0,39 <sup>b1</sup> |
| PesoPlacenta* | 0,49 ± 0,07 <sup>a</sup> | 0,52 ± 0,07 <sup>a1</sup> | 0,59 ± 0,10 <sup>b</sup> | 0,74 ± 0,17 <sup>b1</sup> |
| ÍP*           | 0,28 ± 0,04 <sup>a</sup> | 0,11 ± 0,02 <sup>a1</sup> | 0,47 ± 0,13 <sup>b</sup> | 0,21 ± 0,06 <sup>b1</sup> |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabético) no 18° e 21° dias ( $p \geq 0,05$ ) para cada variável estudada.

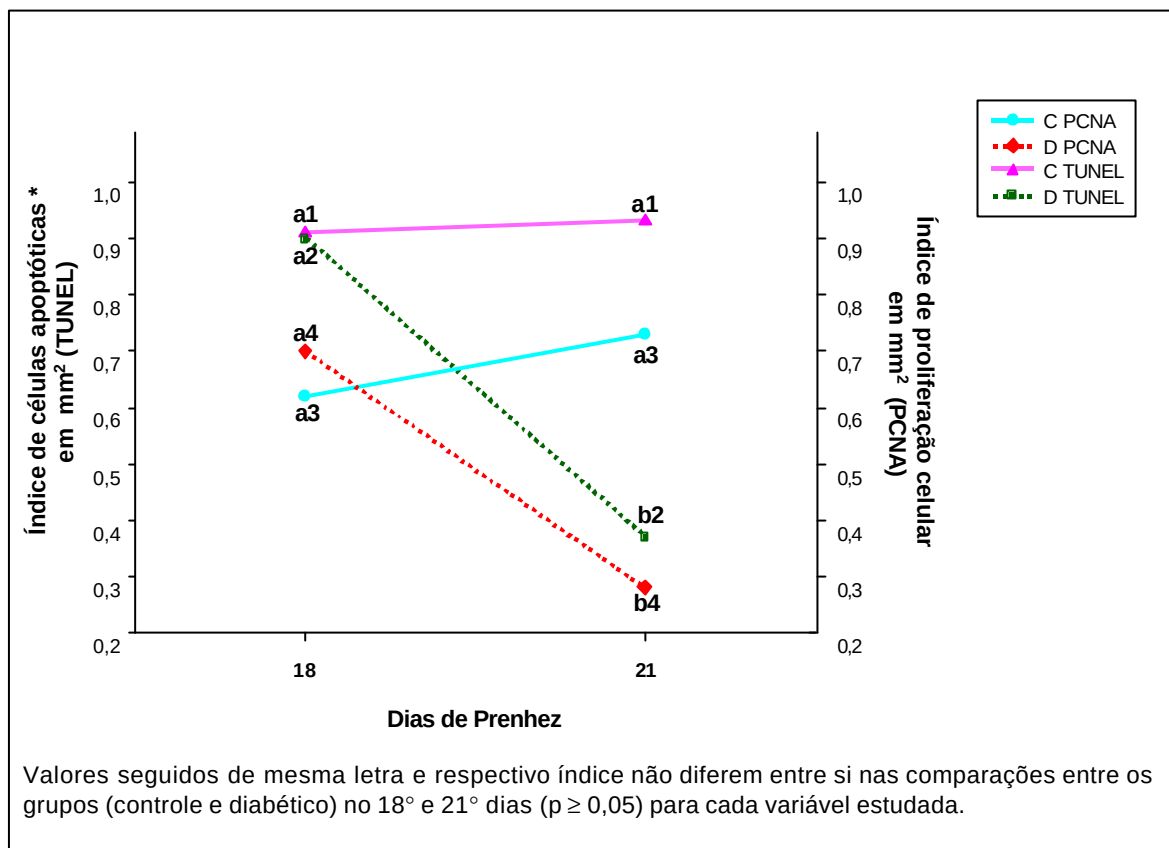


**Figura 3.** Evolução dos índices de proliferação celular ( $\text{mm}^2$ ) e apoptose ( $\text{mm}^2$ ) do 18º e 21º dias na prenhez de ratas dos grupos controle e com diabetes grave.

**Tabela 2.** Proporção (%) de recém-nascidos (RN) PIP e N-PIP, média e desvio-padrão dos índices de proliferação celular ( $I_{PCNA}$ ) e apoptose ( $I_{TUNEL}$ ) por  $\text{mm}^2$  nas placentas de ratas controle e com diabetes grave no 18° e 21° dias de prenhez.

|                | Controle          |                      | Diabética         |                      |
|----------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                | 18°               | 21°                  | 18°               | 21°                  |
| <b>RN-PIP</b>  |                   |                      |                   |                      |
| %RNPIP*        | 12,0 <sup>a</sup> | 8,0 <sup>a1</sup>    | 64,0 <sup>b</sup> | 100,0 <sup>b1</sup>  |
| $I_{PCNA}^*$   | $0,71 \pm 0,32^a$ | $0,82 \pm 0,14^{a1}$ | $0,71 \pm 0,27^a$ | $0,28 \pm 0,09^{b1}$ |
| $I_{TUNEL}^*$  | $0,88 \pm 0,06^a$ | $0,84 \pm 0,13^{a1}$ | $0,93 \pm 0,14^a$ | $0,37 \pm 0,10^{b1}$ |
| <b>RN-NPIP</b> |                   |                      |                   |                      |
| %RN-NPIP*      | 88,0 <sup>a</sup> | 92,0 <sup>a1</sup>   | 36,0 <sup>b</sup> | 0,0                  |
| $I_{PCNA}^*$   | $0,61 \pm 0,25^a$ | $0,73 \pm 0,22^{a1}$ | $0,68 \pm 0,23^a$ | -                    |
| $I_{TUNEL}^*$  | $0,92 \pm 0,15^a$ | $0,93 \pm 0,17^{a1}$ | $0,85 \pm 0,15^a$ | -                    |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabético) no 18° e 21° dias ( $p \geq 0,05$ ) para cada variável estudada.

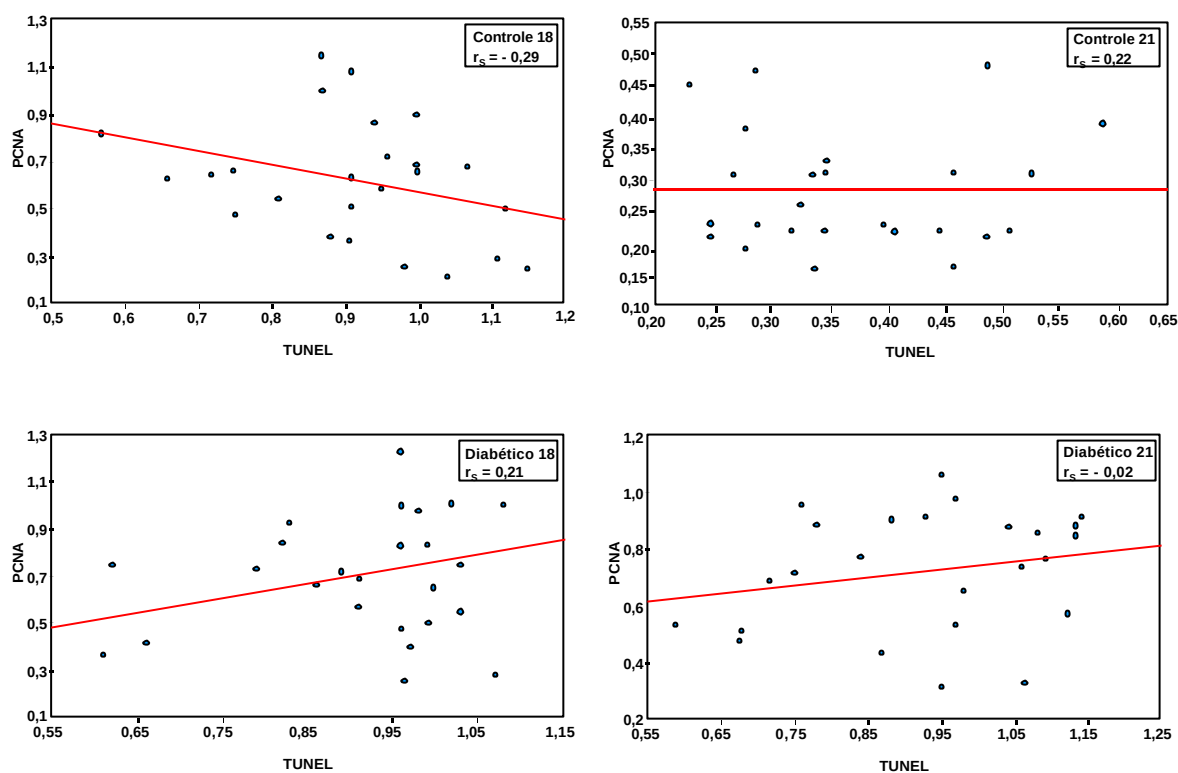


**Figura 4.** Coeficiente de correlação de Spearman entre os índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) nos grupos controle e com diabetes grave de 18 e 21 dias.

**Tabela 3.** Índices de proliferação celular ( $I_{PCNA}$ ) e de apoptose placentária ( $I_{TUNEL}$ ) por  $\text{mm}^2$  no 18° e 21° dias de prenhez de ratas dos grupos controle e diabetes grave e coeficiente de correlação de Spearman ( $r_S$ ) com o peso(g) dos recém-nascidos (RN) e com a média (mg/dL) glicêmica da prenhez (MG).

|                                          | Controle          |                      | Diabética         |                      |
|------------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                                          | 18°               | 21°                  | 18°               | 21°                  |
| <b>PCNA</b>                              |                   |                      |                   |                      |
| $I_{PCNA}^*$                             | $0,62 \pm 0,25^a$ | $0,73 \pm 0,21^{a1}$ | $0,70 \pm 0,25^a$ | $0,28 \pm 0,09^{b1}$ |
| $r_S \text{ PCNA/Peso RN}$               | 0,07              | 0,19                 | -0,20             | -0,09                |
| $r_S \text{ PCNA/MG}$                    | 0,45              | -0,08                | -0,10             | -0,09                |
| <b>Apoptose</b>                          |                   |                      |                   |                      |
| $I_{TUNEL}^*$                            | $0,91 \pm 0,14^a$ | $0,93 \pm 0,16^{a1}$ | $0,90 \pm 0,14^a$ | $0,37 \pm 0,10^{b1}$ |
| $r_S \text{ I}_{TUNEL} / \text{Peso RN}$ | 0,08              | 0,45**               | -0,23             | -0,29                |
| $r_S \text{ I}_{TUNEL} / \text{MG}$      | 0,10              | 0,002                | 0,35              | -0,26                |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabético) no 18° e 21° dias ( $p \geq 0,05$ ) para cada variável estudada.

\*\*significativo  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

O diabetes grave em ratas, com 100% dos recém-nascidos PIP no 21º dia, diminuiu significativamente os índices de PCNA e de apoptose do 18º para o 21º dias de prenhez (Figura 1). As células placentárias diminuíram sua capacidade de proliferação e de morte no final da prenhez.

Conforme a placenta cresce e envelhece ocorrem alterações histopatológicas que sugerem aumento na eficiência de transporte para satisfazer as exigências metabólicas do crescimento fetal. Nos casos de RCIU há alteração nesse mecanismo e o feto não se desenvolve. Smith et al. (1997<sup>a</sup>) demonstraram aumento da incidência de apoptose nas células das placentas de gestações complicadas por RCIU.

Nelson (1996) questionou se o processo de apoptose trofoblástica contribui para a descontinuidade no sincício ou se o depósito de fibrina é que estimula a morte celular. Na opinião do autor, a apoptose do sinciotrofoblasto precedeu a perda na integridade do sincício e o depósito de fibrina na lâmina basal exposta.

Baseado na opinião de Nelson (1996) e nos baixos índices de apoptose encontrados em placenta de ratas diabéticas, pode-se inferir que o achado histopatológico de espessamento da membrana de troca decorre do bloqueio da atividade celular de morte programada. A causa pode ser devida à manutenção do glicogênio placentário no 21º dia de prenhez (Calderon et al., 1999).

A revisão feita por Mayhew (2001) sobre a modificação do trofoblasto ao longo da gestação, destacou os resultados de Smith et al. (1997<sup>a</sup>) indicando que a frequência de núcleos apoptóticos dentro da vilosidade não varia de acordo com as regiões da placenta, mas aumenta de 0,07% no primeiro trimestre para 0,14% no terceiro trimestre e que 50% da apoptose está no trofoblasto: isso significa aumento no número de núcleos apoptóticos no trofoblasto. Este aumento da proporção do “pool” de apoptose no final da gravidez pode contribuir para o gradual adelgamento do trofoblasto. Assim, como nas placentas de ratas diabéticas houve diminuição da apoptose é fácil entender que as membranas placentárias tenham permanecido espessas, conforme mostrado em trabalho anterior (Calderon et al., 1999).

Além de diminuir a apoptose houve diminuição da proliferação celular no final da prenhez das ratas diabéticas. O que teria levado a esta alteração da homeostasia tecidual nas placentas de ratas diabéticas? A causa poderia decorrer da deposição de glicogênio placentário (Calderon et al., 1999) que deve ter transmitido à célula um sinal inibidor de apoptose e de necessidade de proliferação celular. Trabalho anterior evidenciou que nas placentas de ratas com diabetes grave há aumento do DNA no final da prenhez (Calderon et al., 1999). O entendimento dos autores era que estaria ocorrendo aumento da replicação celular. Com os resultados de diminuição do PCNA (Figura 3) mostrando que há diminuição da replicação do DNA, provavelmente, esteja ocorrendo uma disfunção celular com retardo na replicação do DNA.

Levy e Nelson (2000) salientaram que a apoptose pode eliminar células anormais que estão expostas ao estresse exógeno.

Talvez a manutenção do glicogênio intracelular no final da prenhez tenha alterado o controle que regula a morte celular programada na placenta de ratas diabéticas.

Pampfer (2000) fez revisão sobre apoptose em embriões no período de pré-implantação com objetivo de analisar o impacto da hiperglicemia no metabolismo do blastocisto mostrando que esse será um modelo interessante para novos estudos. Evidenciou alguns sinais anti-apoptóticos, como o TGF- $\alpha$  e outros pró-apoptóticos, como os radicais livres de oxigênio. Sugeriu a possibilidade das células com diferentes determinantes anti e pró-apoptóticos serem geradas no blastocisto, dependendo da expressão da proteína dominante.

Trabalhos experimentais indicam que a hiperglicemia aumenta a incidência de células apoptóticas nas células do nó embrionário e, que esta alteração metabólica pode estimular o processo de eliminação celular programado para esse estágio (Moley et al., 1998<sup>b</sup>).

Budd et al. (2002) admitem em seu editorial que os receptores de sinais de morte celular podem ser promotores do crescimento celular. A literatura, entretanto, não explica os dois fenômenos, proliferação celular e apoptose, diminuindo concomitantemente. De acordo com Chan et al. (1999), a relação inversa entre os índices de proliferação celular e apoptose no primeiro trimestre da gravidez evidencia processo ativo de remodelação do trofoblasto. Este resultado ocorreu no grupo controle no 18º dia da prenhez. (Figura 4). No grupo diabético, a correlação positiva entre PCNA e TUNEL no 18º dia evidencia um processo de remodelação tecidual diferente do grupo controle que é semelhante ao grupo controle de 21 dias

(Figura 4). O tecido placentário das ratas diabéticas no 21º parece evidenciar uma inércia intensa do trofoblasto: menor proliferação celular e menor apoptose, fenômeno que poderia estar levando ao espessamento da membrana de troca. O controle desse processo é multifatorial (Chan et al., 1999), mas é provável que os fatores locais reguladores da proliferação celular e da apoptose tenham papel importante no balanço entre os dois processos. O glicogênio aumentado nas placentas das ratas diabéticas (Calderon et al., 1999), talvez, seja um desses fatores. Os resultados deste trabalho são inéditos, portanto, impediram a comparação com outros autores.

Apesar do diabetes grave em ratas ser modelo de RCIU, a fisiopatologia desta restrição é controversa. Crocker et al. (2001) demonstraram que a hipóxia “in vitro” é gatilho desencadeador de apoptose na placenta. A apoptose excessiva pode ocasionar redução no tamanho placentário e extrusão excessiva do material trofoblástico na circulação materna. Nas ratas com diabetes grave, o peso fetal é pequeno, a placenta é grande e o índice de apoptose é baixo, sugerindo que este modelo de RCIU é metabólico e não hipóxico. Não há passagem de nutrientes ao feto porque a membrana é espessa e insuficiente na sua função nutritiva.

Esses achados podem ter interessante correlação clínica na morte súbita dos fetos das mulheres diabéticas, não detectada pelos métodos de avaliação de bem-estar fetal que, na sua maioria, analisam o modelo hipóxico. A diminuição na contagem dos movimentos fetais, método propedêutico importante na avaliação do bem-estar fetal no diabetes, parece evidenciar esse catatonismo metabólico placentário.

Há ainda referência à possível distribuição heterogênea das várias proteínas reguladoras entre o nó embrionário e as células trofoectodérmicas, incluindo alguns efetores anti e pró-apoptóticos. Esse mecanismo pode tornar ainda mais complexo o fenômeno da morte celular programada.

Publicações sobre o metabolismo de glicose no blastocisto e o impacto da hiperglicemia no seu desenvolvimento fornecem oportunidade para discutir as diferentes rotas de alteração do controle do crescimento embrionário no momento da implantação. Os dados até agora existentes sugerem que altos níveis de glicose alteram o transporte trans-epitelial do trofoectoderma, modificam os níveis do estresse oxidativo embriônico, fazem com que numerosas células do nó embrionário entrem em apoptose e, finalmente, afetam a interação reguladora complexa entre o nó embrionário e as células do trofoectoderma (Pampfer, 2000).

Diante de tantas possibilidades torna-se impossível estabelecer, de modo definitivo, a fisiopatologia da RCIU na prenhez de ratas diabéticas. Além da diminuição da apoptose e proliferação celular observada nesse trabalho, outros projetos de pesquisa devem ser desenvolvidos para responder a esses questionamentos, entre eles:

1. Relação entre os índices de proliferação celular e apoptose com a morfometria placentária no diabetes experimental;
2. Estudo da proliferação celular e apoptose nas placentas de gestantes diabéticas;
3. Estudo da proliferação celular e apoptose em placentas de outros modelos de RCIU: hipertensão arterial, gêmeos com pesos discordantes e má adaptação do organismo materno à gestação.

Em conclusão detectamos que, no final da prenhez de ratas com diabetes grave, com 100% de RN-PIP, a placenta caracterizou-se por menores índices de proliferação celular e de apoptose; os índices de proliferação celular e apoptose diminuíram do 18º para o 21º dias de prenhez nas placentas de ratas com diabetes grave e mantiveram-se constantes no grupo controle; Os índices de proliferação celular e de apoptose foram menores nas placentas de RN-PIP nas ratas diabéticas de 21 dias, porém, não houve diferença entre os índices de proliferação celular e apoptose nas placentas de RN-PIP e N-PIP dos grupos controle e diabético de 18 dias. Os índices de apoptose e proliferação celular não se correlacionaram com o peso do recém-nascido e com a média glicêmica da prenhez.

**Agradecimentos:** A Capes, por ter financiado este trabalho, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização.

## REFERÊNCIAS

**Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ & Lessey BA.** (2000) Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, **96**, 271–276.

**Almeida FCG** (2002) Sistema de defesa antioxidante hepático de ratas prenhes diabéticas tratadas com extrato de *Ginkgo biloba*: repercussão sobre a performance reprodutiva e o resultado perinatal. Tese, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

**Bravo R, Frank R, Blundell, PA & Macdonald-Bravo, H** (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature*, **326**, 515–517.

**Budd RC** (2002) Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest*, **109**(4), 437–441.

**Calderon IMP, Rudge MVC, Brasil MAM & Henry MACA** (1992) Diabetes e gravidez experimental em ratas: indução do diabetes, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cir Brasil*, **7**(4), 142–146.

**Calderon IMP, Rudge MVC, Ramos MD & Peraçoli JC** (1999) Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico, de placenta de ratas diabéticas: relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intra-uterino. *Rev Bras Ginecol e Obstet*, **21**(2), 91–98.

**Chan CC, Lao TT & Cheung AN (1999)** Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. *Placenta*, **20**, 223–227.

**Consonni M (1999)**. Efeito da suplementação oral dos ácidos linoleico e gamalinoleico em prenhez de ratas diabéticas. Tese, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

**Crocker IP, Barrat S, Kaur M & Baker PN (2001)** The in vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblast and syncytiotrophoblasts. *Placenta*, **22**, 822–830.

**Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, Rudge MVC (2002)** Oxidative and diabetes in pregnant rats. *Animal Reproduction Science* (no prelo).

**Davies J & Glasser SR (1968)** Organization of normal placenta. *Acta anat*, **69**, 542–608.

**Gewolb IH, Barret C & Warsham JB (1983)** Placental growth and glycogen metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Pediatr Res*, **17**, 587–591.

**Gewolb IH, Meridian W, Warsham JB & Enders AC (1986)** Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes*, **34**, 81–88.

**Halperin R, Peller S, Sandabank, Bukovsky & Schneider D (2000)** Expression of P53 gene and apoptosis in gestacional trophoblastic disease. *Placenta*, **21**, 58–62.

- Hsu SM, Raine L & Fanger N** (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem. Cytochem*, **29**, 557–80.
- Kudo T, Izutsu T & Sato T** (2000) Telomerase activity and apoptosis as indicators of ageing in placenta with and without intrauterine growth retardation. *Placenta*, **21**, 493–500.
- Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PH, Kraus FT, Sadovsky Y & Nelson, M** (2002) Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol*, **186**, 1056–1061.
- Mayhew TM** (2001) Villous of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol*, **16**, 1213–1224.
- McCormick D & Hall, PA** (1992) The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, **21**: 591–94.
- Moley KH** (1988) Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am J Physiol*, **275**, E38–E47.
- Nelson DM** (1996) Apoptotic changes in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta*, **17**, 387–391.
- Pampfer S & Hertogh R** (1996) Pre-implantation embryopathy associate with maternal diabetes. *Diab Rev*, **4**, 90–113.

**Pampfer S** (2000) Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages- a review. *Placenta*, **21**, supl14, S3–S10.

**Paschoini MC** (2002). Influência das síndromes hipertensivas sobre a apoptose placentária. Tese, Universidade de São Paulo –USP.

**Prelich G, Tan C-K, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey, KM & Stillman B** (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-  $\delta$  auxiliary protein. *Nature*, **326**, 517–520.

**Rudge MVC, Calderon IPM, Maestá I, Ramos MD, Peraçoli JC & Curi P** (1998) Insulinoterapia na prenhez de ratas diabéticas: repercussões fetais e placentárias. *Rev Bras Ginecol e Obstet*, **20**(1), 19–24.

**Schwartzman RA & Cidlowski JA** (1993) Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, **14**, 133–151.

**Smith SC, Baker PN & Symonds EM** (1997<sup>a</sup>) Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, **177**(1), 57–65.

**Smith SC, Baker PN & Symonds EM** (1997<sup>b</sup>) Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Osbst Gynecol*, **177**(6), 1395–1401.

**Snedecor GW & Cochran WG** (1980) *Statistical methods* (7 Ed). Ames, Iowa State University. 505pp.

**Volpato GT** (2001) Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com o extrato aquoso de folhas de *Bauhinia fortificata* (pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas. Dissertação, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

**Zar JR** (1984) *Bioestatistical analysis* (2 Ed). Englewood Cliffs: Prentice Hall. 718pp.

# ANEXOS

**Anexo 1.** Termo de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética na Experimentação Animal.

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CÂMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA

**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - FONE E FAX (014) 6802-6143

---

**CERTIFICADO**

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 227 , sobre o projeto de pesquisa intitulado “A apoptose na placenta de ratas diabéticas”, sob a responsabilidade de Elaine Cristina Nunes Fagundes Costa, com a orientação da Profª. Drª. Marilza Vieira Cunha Rudge, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

**Projeto de Pesquisa Aprovado em 29/10/2001**

Botucatu, em 29 de outubro de 2001

  
Prof. Dr. Antero F. Macedo Miranda  
Presidente da CEEA

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA

## Anexo 2. TABELAS

**Tabela 1.** Valores de glicemia (mg/dl) materna (MG) ao longo do período de prenhez em ratas controle e diabética.

| MG(mg/dl) | Controle               |                          | Diabético               |                          |
|-----------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|           | 18 dias                | 21 dias                  | 18 dias                 | 21 dias                  |
| dia zero* | 65,6±17,2 <sup>a</sup> | 88,4±10,4 <sup>a1</sup>  | 378,4±52,2 <sup>b</sup> | 382±16,5 <sup>b1</sup>   |
| 7º dia*   | 76,4±12,8 <sup>a</sup> | 109,8±30,7 <sup>a1</sup> | 263,8±32,5 <sup>b</sup> | 410,4±42,5 <sup>b1</sup> |
| 14º dia*  | 89,4± 7,0 <sup>a</sup> | 73±12,7 <sup>a1</sup>    | 289,6±37,6 <sup>b</sup> | 438±39,6 <sup>b1</sup>   |
| 18º dia*  | 90,4±7,4 <sup>a</sup>  | -                        | 356±33,61 <sup>b</sup>  | -                        |
| 21º dia*  | -                      | 60,6±2,2 <sup>a</sup>    | -                       | 378,6±113,1 <sup>b</sup> |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) de 18 e 21 dias ( $p \geq 0,05$ ), em cada momento da prenhez avaliado.

**Tabela 2.** Pesos maternos (g) ao longo da prenhez em ratas controle e diabéticas de 18 e 21 dias.

| Peso (g)  | Controle                |                           | Diabético               |                           |
|-----------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|           | 18 dias                 | 21 dias                   | 18 dias                 | 21 dias                   |
| dia zero* | 259,6±19,0 <sup>a</sup> | 239,4±28,8 <sup>a1</sup>  | 255,2±17,1 <sup>a</sup> | 247,8±25,1 <sup>a1</sup>  |
| 7º dia*   | 285,2±35,7 <sup>a</sup> | 266,2±23,9 <sup>a1</sup>  | 268,2±26,3 <sup>a</sup> | 264,0±26,8 <sup>a1</sup>  |
| 14º dia*  | 326,2±17,7 <sup>a</sup> | 298,6±29,41 <sup>a1</sup> | 284,4±23,1 <sup>b</sup> | 280,8±25,64 <sup>a1</sup> |
| 18º dia*  | 342,4±34,5 <sup>a</sup> | -                         | 294,0±26,5 <sup>b</sup> | -                         |
| 21º dia*  | -                       | 384,2±29,4 <sup>a</sup>   | -                       | 330,6±35,9 <sup>b</sup>   |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) de 18 e 21 dias ( $p \geq 0,05$ ), em cada momento da prenhez avaliado.

**Tabela 3.** Médias do pesos (g) materno, placentário e fetal, índice placentário (IP), média glicêmica (mg/dl) da prenhez e classificação dos recém-nascidos (RN) das 5 ratas do grupo controle de 18 dias.

| Rata  | Placenta | Média Peso materno | Peso placenta | Peso fetal | IP   | Média glicêmica | ClassRN |
|-------|----------|--------------------|---------------|------------|------|-----------------|---------|
| 1     | 1        | 317,50             | 0,48          | 1,56       | 0,30 | 82,50           | AIP     |
| 1     | 2        |                    | 0,46          | 1,55       | 0,30 |                 | AIP     |
| 1     | 3        |                    | 0,5           | 1,55       | 0,32 |                 | AIP     |
| 1     | 4        |                    | 0,55          | 1,45       | 0,37 |                 | AIP     |
| 1     | 5        |                    | 0,45          | 1,39       | 0,29 |                 | AIP     |
| 2     | 6        | 288,25             | 0,49          | 1,30       | 0,37 | 77,75           | PIP     |
| 2     | 7        |                    | 0,38          | 1,42       | 0,25 |                 | AIP     |
| 2     | 8        |                    | 0,44          | 1,36       | 0,32 |                 | AIP     |
| 2     | 9        |                    | 0,38          | 1,12       | 0,34 |                 | PIP     |
| 2     | 10       |                    | 0,46          | 1,45       | 0,33 |                 | AIP     |
| 3     | 11       | 317,50             | 0,48          | 1,54       | 0,24 | 87,50           | AIP     |
| 3     | 12       |                    | 0,5           | 1,60       | 0,22 |                 | AIP     |
| 3     | 13       |                    | 0,55          | 1,54       | 0,25 |                 | AIP     |
| 3     | 14       |                    | 0,56          | 1,79       | 0,24 |                 | GIP     |
| 3     | 15       |                    | 0,55          | 1,81       | 0,23 |                 | GIP     |
| 4     | 16       | 299,50             | 0,55          | 1,78       | 0,23 | 74,00           | GIP     |
| 4     | 17       |                    | 0,57          | 1,66       | 0,25 |                 | AIP     |
| 4     | 18       |                    | 0,64          | 1,63       | 0,28 |                 | AIP     |
| 4     | 19       |                    | 0,54          | 1,56       | 0,26 |                 | AIP     |
| 4     | 20       |                    | 0,56          | 1,57       | 0,25 |                 | AIP     |
| 5     | 21       | 294,00             | 0,49          | 1,78       | 0,21 | 77,25           | GIP     |
| 5     | 22       |                    | 0,37          | 1,53       | 0,24 |                 | AIP     |
| 5     | 23       |                    | 0,40          | 1,40       | 0,28 |                 | AIP     |
| 5     | 24       |                    | 0,38          | 1,19       | 0,30 |                 | PIP     |
| 5     | 25       |                    | 0,41          | 1,44       | 0,28 |                 | AIP     |
| Média |          | 303,35             | 0,49          | 1,52       | 0,28 | 79,80           |         |
| DP    |          | 13,52              | 0,07          | 0,17       | 0,04 | 4,81            |         |

PIP, AIP, GIP = Peso pequeno, adequado e grande para a idade de prenhez, respectivamente.

**Tabela 4.** Médias dos pesos (g) materno, placentário e fetal, índice placentário (IP), média glicêmica (mg/dl) da prenhez e classificação dos recém-nascidos (RN) das 5 ratas do grupo controle de 21 dias.

| Rata  | Placenta | Média<br>Peso materno | Peso<br>placenta | Peso<br>fetal | IP   | Média<br>glicêmica | Classificação<br>do RN |
|-------|----------|-----------------------|------------------|---------------|------|--------------------|------------------------|
| 6     | 26       | 285,00                | 0,43             | 4,50          | 0,10 | 104,75             | AIP                    |
| 6     | 27       |                       | 0,54             | 4,44          | 0,12 |                    | PIP                    |
| 6     | 28       |                       | 0,48             | 4,84          | 0,10 |                    | AIP                    |
| 6     | 29       |                       | 0,47             | 5,04          | 0,09 |                    | AIP                    |
| 6     | 30       |                       | 0,39             | 4,49          | 0,09 |                    | AIP                    |
| 7     | 31       | 272,50                | 0,57             | 5,43          | 0,10 | 76,50              | GIP                    |
| 7     | 32       |                       | 0,53             | 5,11          | 0,10 |                    | AIP                    |
| 7     | 33       |                       | 0,52             | 4,36          | 0,10 |                    | PIP                    |
| 7     | 34       |                       | 0,49             | 4,75          | 0,10 |                    | AIP                    |
| 7     | 35       |                       | 0,52             | 5,25          | 0,10 |                    | GIP                    |
| 8     | 36       | 278,50                | 0,44             | 4,91          | 0,09 | 83,00              | AIP                    |
| 8     | 37       |                       | 0,47             | 5,11          | 0,09 |                    | AIP                    |
| 8     | 38       |                       | 0,52             | 5,35          | 0,10 |                    | GIP                    |
| 8     | 39       |                       | 0,48             | 5,07          | 0,09 |                    | AIP                    |
| 8     | 40       |                       | 0,50             | 4,75          | 0,10 |                    | AIP                    |
| 9     | 41       | 312,00                | 0,45             | 4,82          | 0,09 | 81,25              | AIP                    |
| 9     | 42       |                       | 0,44             | 4,51          | 0,10 |                    | AIP                    |
| 9     | 43       |                       | 0,60             | 4,49          | 0,13 |                    | AIP                    |
| 9     | 44       |                       | 0,58             | 4,52          | 0,13 |                    | AIP                    |
| 9     | 45       |                       | 0,67             | 4,93          | 0,13 |                    | AIP                    |
| 10    | 46       | 337,25                | 0,57             | 4,68          | 0,12 | 69,25              | AIP                    |
| 10    | 47       |                       | 0,56             | 5,39          | 0,10 |                    | GIP                    |
| 10    | 48       |                       | 0,70             | 4,63          | 0,15 |                    | AIP                    |
| 10    | 49       |                       | 0,56             | 4,71          | 0,12 |                    | AIP                    |
| 10    | 50       |                       | 0,51             | 4,45          | 0,11 |                    | AIP                    |
| Média |          | 297,05                | 0,52             | 4,82          | 0,11 | 83,00              |                        |
| DP    |          | 24,21                 | 0,07             | 0,32          | 0,02 | 12,14              |                        |

PIP, AIP, GIP = Peso pequeno, adequado e grande para a idade de prenhez, respectivamente.

**Tabela 5.** Média do peso (g) materno, placentário e fetal , índice placentário (IP), média glicêmica (mg/dl) da prenhez e classificação dos recém-nascidos (RN) das 5 ratas do grupo diabético de 18 dias.

| Rata  | Placenta | Média<br>Peso materno | Peso<br>placenta | Peso fetal | IP   | Média<br>glicêmica | Classificação<br>Do RN |
|-------|----------|-----------------------|------------------|------------|------|--------------------|------------------------|
| 11    | 51       | 249,75                | 0,48             | 1,59       | 0,30 | 316,75             | AIP                    |
| 11    | 52       |                       | 0,58             | 1,20       | 0,40 |                    | PIP                    |
| 11    | 53       |                       | 0,56             | 0,95       | 0,58 |                    | PIP                    |
| 11    | 54       |                       | 0,67             | 1,00       | 0,65 |                    | PIP                    |
| 11    | 55       |                       | 0,74             | 0,85       | 0,87 |                    | PIP                    |
| 12    | 56       | 292,50                | 0,49             | 1,40       | 0,35 | 340,25             | AIP                    |
| 12    | 57       |                       | 0,61             | 1,38       | 0,44 |                    | AIP                    |
| 12    | 58       |                       | 0,59             | 1,28       | 0,46 |                    | PIP                    |
| 12    | 59       |                       | 0,61             | 1,32       | 0,46 |                    | AIP                    |
| 12    | 60       |                       | 0,57             | 1,12       | 0,51 |                    | PIP                    |
| 13    | 61       | 265,75                | 0,64             | 1,36       | 0,47 | 283,75             | AIP                    |
| 13    | 62       |                       | 0,54             | 1,55       | 0,35 |                    | AIP                    |
| 13    | 63       |                       | 0,53             | 1,58       | 0,33 |                    | AIP                    |
| 13    | 64       |                       | 0,94             | 1,00       | 0,40 |                    | PIP                    |
| 13    | 65       |                       | 0,45             | 1,42       | 0,32 |                    | AIP                    |
| 14    | 66       | 302,25                | 0,50             | 1,00       | 0,50 | 335,50             | PIP                    |
| 14    | 67       |                       | 0,50             | 1,16       | 0,43 |                    | PIP                    |
| 14    | 68       |                       | 0,59             | 1,24       | 0,47 |                    | PIP                    |
| 14    | 69       |                       | 0,57             | 1,23       | 0,46 |                    | PIP                    |
| 14    | 70       |                       | 0,66             | 1,26       | 0,52 |                    | PIP                    |
| 15    | 71       | 266,50                | 0,57             | 1,11       | 0,55 | 333,50             | PIP                    |
| 15    | 72       |                       | 0,56             | 1,17       | 0,53 |                    | PIP                    |
| 15    | 73       |                       | 0,70             | 1,00       | 0,45 |                    | PIP                    |
| 15    | 74       |                       | 0,56             | 1,62       | 0,38 |                    | AIP                    |
| 15    | 75       |                       | 0,51             | 1,17       | 0,67 |                    | PIP                    |
| Média |          | 275,35                | 0,59             | 1,24       | 0,47 | 322,00             |                        |
| DP    |          | 19,20                 | 0,10             | 0,21       | 0,13 | 21,10              |                        |

PIP, AIP, GIP = Peso pequeno, adequado e grande para a idade de prenhez, respectivamente.

**Tabela 6.** Média dos pesos (g) materno, placentário e fetal , índice placentário (IP), média glicêmica (mg/dl) da prenhez e classificação dos recém-nascidos (RN) das 5 ratas do grupo diabético de 21 dias.

| Rata  | Placenta | Média<br>Peso materno | Peso<br>placenta | Peso<br>fetal | IP   | Média<br>glicêmica | Classificação<br>do RN |
|-------|----------|-----------------------|------------------|---------------|------|--------------------|------------------------|
| 16    | 76       | 243,75                | 0,83             | 3,36          | 0,25 | 405,25             | PIP                    |
| 16    | 77       |                       | 1,04             | 3,61          | 0,29 |                    | PIP                    |
| 16    | 78       |                       | 1,24             | 2,86          | 0,43 |                    | PIP                    |
| 16    | 79       |                       | 0,73             | 3,19          | 0,22 |                    | PIP                    |
| 16    | 80       |                       | 0,82             | 3,37          | 0,26 |                    | PIP                    |
| 17    | 81       | 314,5                 | 0,90             | 3,30          | 0,27 | 395,25             | PIP                    |
| 17    | 82       |                       | 0,57             | 3,33          | 0,17 |                    | PIP                    |
| 17    | 83       |                       | 0,55             | 3,55          | 0,15 |                    | PIP                    |
| 17    | 84       |                       | 0,92             | 4,02          | 0,22 |                    | PIP                    |
| 17    | 85       |                       | 0,90             | 4,09          | 0,22 |                    | PIP                    |
| 18    | 86       | 292,75                | 0,68             | 3,72          | 0,18 | 362,75             | PIP                    |
| 18    | 87       |                       | 0,65             | 3,75          | 0,17 |                    | PIP                    |
| 18    | 88       |                       | 0,84             | 3,02          | 0,28 |                    | PIP                    |
| 18    | 89       |                       | 0,65             | 3,18          | 0,18 |                    | PIP                    |
| 18    | 90       |                       | 0,77             | 3,52          | 0,24 |                    | PIP                    |
| 19    | 91       | 278,75                | 0,86             | 2,92          | 0,29 | 405                | PIP                    |
| 19    | 92       |                       | 0,80             | 3,14          | 0,25 |                    | PIP                    |
| 19    | 93       |                       | 0,57             | 3,43          | 0,17 |                    | PIP                    |
| 19    | 94       |                       | 0,57             | 2,83          | 0,18 |                    | PIP                    |
| 19    | 95       |                       | 0,64             | 3,59          | 0,21 |                    | PIP                    |
| 20    | 96       | 274,25                | 0,67             | 3,58          | 0,19 | 442,25             | PIP                    |
| 20    | 97       |                       | 0,58             | 3,82          | 0,15 |                    | PIP                    |
| 20    | 98       |                       | 0,64             | 3,98          | 0,16 |                    | PIP                    |
| 20    | 99       |                       | 0,64             | 3,19          | 0,15 |                    | PIP                    |
| 20    | 100      |                       | 0,62             | 4,33          | 0,19 |                    | PIP                    |
| Média |          | 280,80                | 0,74             | 3,47          | 0,21 | 402,10             |                        |
| DP    |          | 23,23                 | 0,17             | 0,39          | 0,06 | 25,92              |                        |

PIP, AIP, GIP = Peso pequeno, adequado e grande para a idade de prenhez, respectivamente.

**Tabela 7.** Número (n) e porcentagem (%) de recém-nascidos (RN) com peso pequeno (PIP), adequado (AIP) e grande (GIP) para a idade de prenhez no 18° e 21° dias nas ratas dos grupos controle e diabético.

| Classe RN |  | 18dias          | 21dias           | 18dias          | 21dias           |
|-----------|--|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| RN-PIP*   |  |                 |                  |                 |                  |
| N         |  | 3 <sup>a</sup>  | 2 <sup>a1</sup>  | 16 <sup>b</sup> | 25 <sup>b1</sup> |
| %         |  | 12,0            | 8,0              | 64,0            | 100,0            |
| RN-AIP*   |  |                 |                  |                 |                  |
| n         |  | 18 <sup>a</sup> | 19 <sup>a1</sup> | 9 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b1</sup>  |
| %         |  | 72,0            | 76,0             | 36,0            | 0,0              |
| RN-GIP*   |  |                 |                  |                 |                  |
| n         |  | 4 <sup>a</sup>  | 4 <sup>a1</sup>  | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b1</sup>  |
| %         |  | 16,0            | 16,0             | 0,0             | 0,0              |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) de 18 e 21 dias ( $p \geq 0,05$ ), em cada classe de RN avaliada.

**Tabela 8.** Número (n) e porcentagem (%) de recém-nascidos (RN) PIP e N-PIP para a idade de prenhez no 18º e 21º dias nas ratas dos grupos controle e diabético.

| Classes RN |   | 18dias          | 21dias           | 18dias          | 21dias           |
|------------|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| RN-PIP*    |   |                 |                  |                 |                  |
|            | n | 3 <sup>a</sup>  | 2 <sup>a1</sup>  | 16 <sup>b</sup> | 25 <sup>b1</sup> |
|            | % | 12,0            | 8,0              | 64,0            | 100,0            |
| RN-NPIP*   |   |                 |                  |                 |                  |
|            | n | 22 <sup>a</sup> | 23 <sup>a1</sup> | 9 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b1</sup>  |
|            | % | 88,0            | 92,0             | 36,0            | 0,0              |

\* Valores seguidos de mesma letra e respectivo índice não diferem entre si nas comparações entre os grupos (controle e diabete) de 18 e 21 dias ( $p \geq 0,05$ ), em cada classe de RN avaliada.

**Tabela 9.** Número de células apoptóticas totais, por campo e por mm<sup>2</sup>, pelas técnicas de HE e TUNEL e proliferação celular (PCNA), nas 25 placentas das ratas do grupo controle de 18 dias.

| Placentas    | Apoptose           |                   |                   |                    |                   |                   | PCNA               |                   |                   |
|--------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|              | HE                 |                   |                   | Tunel              |                   |                   | Imuno-histoquímica |                   |                   |
|              | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   |
| 1            | 26,00 <sup>a</sup> | 0,52 <sup>b</sup> | 0,07 <sup>c</sup> | 21,52 <sup>a</sup> | 0,86 <sup>d</sup> | 0,57 <sup>e</sup> | 21,80 <sup>a</sup> | 4,36 <sup>f</sup> | 0,81 <sup>g</sup> |
| 2            | 15,00              | 0,30              | 0,04              | 24,88              | 1,00              | 0,66              | 16,80              | 3,36              | 0,63              |
| 3            | 19,00              | 0,38              | 0,05              | 27,08              | 1,08              | 0,72              | 17,20              | 3,44              | 0,64              |
| 4            | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 37,44              | 1,50              | 1,00              | 17,80              | 3,56              | 0,66              |
| 5            | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 35,16              | 1,41              | 0,94              | 23,00              | 4,60              | 0,86              |
| 6            | 17,00              | 0,34              | 0,05              | 30,44              | 1,22              | 0,81              | 14,60              | 2,92              | 0,54              |
| 7            | 26,00              | 0,52              | 0,07              | 34,12              | 1,36              | 0,91              | 9,80               | 1,96              | 0,36              |
| 8            | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 32,80              | 1,31              | 0,87              | 27,00              | 5,40              | 1,00              |
| 9            | 16,00              | 0,32              | 0,04              | 34,00              | 1,36              | 0,91              | 29,00              | 5,80              | 1,08              |
| 10           | 14,00              | 0,28              | 0,04              | 34,00              | 1,36              | 0,91              | 16,80              | 3,36              | 0,63              |
| 11           | 17,00              | 0,34              | 0,05              | 40,28              | 1,61              | 1,07              | 18,20              | 3,64              | 0,68              |
| 12           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 35,60              | 1,42              | 0,95              | 15,80              | 3,16              | 0,59              |
| 13           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 37,52              | 1,50              | 1,00              | 18,40              | 3,68              | 0,68              |
| 14           | 18,00              | 0,36              | 0,05              | 36,04              | 1,44              | 0,96              | 19,40              | 3,88              | 0,72              |
| 15           | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 37,48              | 1,50              | 1,00              | 24,20              | 4,84              | 0,90              |
| 16           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 32,72              | 1,31              | 0,87              | 31,00              | 6,20              | 1,15              |
| 17           | 11,00              | 0,22              | 0,03              | 42,04              | 1,68              | 1,12              | 13,60              | 2,72              | 0,51              |
| 18           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 28,24              | 1,13              | 0,75              | 17,80              | 3,56              | 0,66              |
| 19           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 32,92              | 1,32              | 0,88              | 10,20              | 2,04              | 0,38              |
| 20           | 6,00               | 0,12              | 0,02              | 28,20              | 1,13              | 0,75              | 13,00              | 2,60              | 0,48              |
| 21           | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 43,24              | 1,73              | 1,15              | 6,60               | 1,32              | 0,25              |
| 22           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 38,88              | 1,56              | 1,04              | 5,60               | 1,12              | 0,21              |
| 23           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 41,72              | 1,67              | 1,11              | 7,80               | 1,56              | 0,29              |
| 24           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 34,12              | 1,36              | 0,91              | 13,60              | 2,72              | 0,51              |
| 25           | 13,00              | 0,26              | 0,03              | 36,72              | 1,47              | 0,98              | 7,00               | 1,40              | 0,26              |
| <b>Média</b> | 13,04              | 0,26              | 0,04              | 34,29              | 1,37              | 0,91              | 16,64              | 3,33              | 0,62              |
| <b>SD</b>    | 5,32               | 0,11              | 0,01              | 5,37               | 0,21              | 0,14              | 6,85               | 1,37              | 0,25              |

<sup>a</sup>total de células;<sup>b</sup>total de células dividido por 50 (total de campos contados);<sup>c</sup>total de células dividido por 377 mm<sup>2</sup> (valor da área\* de medida);<sup>d</sup>total de células dividido por 25 (total de campos contados);<sup>e</sup>total de células dividido por 37,54 mm<sup>2</sup> (valor da área medida);<sup>f</sup>total de células dividido por 5 (total de campos contados);<sup>g</sup>total de células dividido por 26,88 (valor da área medida).

\* calculado em função do aumento da objetiva, ocular e optovar.

**Tabela 10.** Número de células apoptóticas totais, por campo e por mm<sup>2</sup>, pelas técnicas de HE e TUNEL, e proliferação celular (PCNA), nas 25 placentas das ratas do grupo controle de 21 dias.

| Placentas    | Apoptose           |                   |                   |                    |                   |                   | PCNA               |                   |                   |
|--------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|              | HE                 |                   |                   | Tunel              |                   |                   | Imuno-histoquímica |                   |                   |
|              | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   |
| 26           | 6,00 <sup>a</sup>  | 0,12 <sup>b</sup> | 0,02 <sup>c</sup> | 25,68 <sup>a</sup> | 1,03 <sup>d</sup> | 0,68 <sup>e</sup> | 14,00 <sup>a</sup> | 2,80 <sup>f</sup> | 0,52 <sup>g</sup> |
| 27           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 28,20              | 1,13              | 0,75              | 19,40              | 3,88              | 0,72              |
| 28           | 11,00              | 0,22              | 0,03              | 31,56              | 1,26              | 0,84              | 21,00              | 4,20              | 0,78              |
| 29           | 13,00              | 0,26              | 0,03              | 35,64              | 1,43              | 0,95              | 8,40               | 1,68              | 0,31              |
| 30           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 39,84              | 1,59              | 1,06              | 20,00              | 4,00              | 0,74              |
| 31           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 40,48              | 1,62              | 1,08              | 23,00              | 4,60              | 0,86              |
| 32           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 42,48              | 1,7               | 1,13              | 22,80              | 4,56              | 0,85              |
| 33           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 35,04              | 1,4               | 0,93              | 24,80              | 4,96              | 0,92              |
| 34           | 5,00               | 0,1               | 0,01              | 38,88              | 1,56              | 1,04              | 23,60              | 4,72              | 0,88              |
| 35           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 33,12              | 1,32              | 0,88              | 24,40              | 4,88              | 0,91              |
| 36           | 5,00               | 0,1               | 0,01              | 39,76              | 1,59              | 1,06              | 9,00               | 1,80              | 0,33              |
| 37           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 40,92              | 1,64              | 1,09              | 20,80              | 4,16              | 0,77              |
| 38           | 6,00               | 0,12              | 0,02              | 42,80              | 1,71              | 1,14              | 24,60              | 4,92              | 0,92              |
| 39           | 6,00               | 0,12              | 0,02              | 35,60              | 1,42              | 0,95              | 28,40              | 5,68              | 1,06              |
| 40           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 41,96              | 1,68              | 1,12              | 15,60              | 3,12              | 0,58              |
| 41           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 29,12              | 1,16              | 0,78              | 24,00              | 4,80              | 0,89              |
| 42           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 36,44              | 1,46              | 0,97              | 14,60              | 2,92              | 0,54              |
| 43           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 36,24              | 1,45              | 0,97              | 26,40              | 5,28              | 0,98              |
| 44           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 22,00              | 0,88              | 0,59              | 14,60              | 2,92              | 0,54              |
| 45           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 28,56              | 1,14              | 0,76              | 25,80              | 5,16              | 0,96              |
| 46           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 32,80              | 1,31              | 0,87              | 11,80              | 2,36              | 0,44              |
| 47           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 36,96              | 1,48              | 0,98              | 17,80              | 3,56              | 0,66              |
| 48           | 10,00              | 0,2               | 0,03              | 42,36              | 1,69              | 1,13              | 23,60              | 4,72              | 0,88              |
| 49           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 26,88              | 1,08              | 0,72              | 18,80              | 3,76              | 0,70              |
| 50           | 10,00 <sup>a</sup> | 0,20 <sup>b</sup> | 0,03 <sup>c</sup> | 25,48 <sup>a</sup> | 1,02 <sup>d</sup> | 0,68 <sup>e</sup> | 13,00 <sup>a</sup> | 2,60 <sup>f</sup> | 0,48 <sup>g</sup> |
| <b>Média</b> | 8,08               | 0,16              | 0,02              | 34,75              | 1,39              | 0,93              | 19,61              | 3,92              | 0,73              |
| <b>SD</b>    | 2,16               | 0,04              | 0,01              | 6,15               | 0,25              | 0,16              | 5,62               | 1,12              | 0,21              |

<sup>a</sup>total de células; <sup>b</sup>total de células dividido por 50 (total de campos contados); <sup>c</sup>total de células dividido por 377 mm<sup>2</sup> (valor da área\* de medida); <sup>d</sup>total de células dividido por 25 (total de campos contados); <sup>e</sup>total de células dividido por 37,54 mm<sup>2</sup> (valor da área medida); <sup>f</sup>total de células dividido por 5 (total de campos contados); <sup>g</sup>total de células dividido por 26,88 (valor da área medida).

\* calculado em função do aumento da objetiva, ocular e optovar.

**Tabela 11.** Número de células apoptóticas totais, por campo e por mm<sup>2</sup>, pelas técnicas de HE e TUNEL, e proliferação celular (PCNA), nas 25 placentas das ratas do grupo diabético de 18 dias.

| Placentas    | Apoptose           |                   |                   |                    |                   |                   | PCNA               |                   |                   |
|--------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|              | HE                 |                   |                   | Tunel              |                   |                   | Imuno-histoquímica |                   |                   |
|              | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   |
| 51           | 11,00 <sup>a</sup> | 0,22 <sup>b</sup> | 0,03 <sup>c</sup> | 24,76 <sup>a</sup> | 0,99 <sup>d</sup> | 0,66 <sup>e</sup> | 11,20 <sup>a</sup> | 2,24 <sup>f</sup> | 0,42 <sup>g</sup> |
| 52           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 23,36              | 0,93              | 0,62              | 20,20              | 4,04              | 0,75              |
| 53           | 6,00               | 0,12              | 0,02              | 36,04              | 1,44              | 0,96              | 26,80              | 5,36              | 1,00              |
| 54           | 13,00              | 0,26              | 0,03              | 34,12              | 1,36              | 0,91              | 15,20              | 3,04              | 0,57              |
| 55           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 38,80              | 1,55              | 1,03              | 20,20              | 4,04              | 0,75              |
| 56           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 22,76              | 0,91              | 0,61              | 6,40               | 1,28              | 0,24              |
| 57           | 13,00              | 0,26              | 0,03              | 37,56              | 1,50              | 1,00              | 17,40              | 3,48              | 0,65              |
| 58           | 11,00              | 0,22              | 0,03              | 40,04              | 1,60              | 1,07              | 7,60               | 1,52              | 0,28              |
| 59           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 38,24              | 1,53              | 1,02              | 27,20              | 5,44              | 1,01              |
| 60           | 11,00              | 0,22              | 0,03              | 36,00              | 1,44              | 0,96              | 12,80              | 2,56              | 0,48              |
| 61           | 7,00               | 0,14              | 0,02              | 29,48              | 1,18              | 0,79              | 19,60              | 3,92              | 0,73              |
| 62           | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 33,36              | 1,33              | 0,89              | 19,40              | 3,88              | 0,72              |
| 63           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 30,64              | 1,23              | 0,82              | 22,60              | 4,52              | 0,84              |
| 64           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 36,52              | 1,46              | 0,97              | 10,60              | 2,12              | 0,39              |
| 65           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 32,40              | 1,30              | 0,86              | 17,80              | 3,56              | 0,66              |
| 66           | 8,00               | 0,16              | 0,02              | 31,04              | 1,24              | 0,83              | 25,00              | 5,00              | 0,93              |
| 67           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 35,92              | 1,44              | 0,96              | 22,20              | 4,44              | 0,83              |
| 68           | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 38,60              | 1,54              | 1,03              | 14,80              | 2,96              | 0,55              |
| 69           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 34,24              | 1,37              | 0,91              | 18,60              | 3,72              | 0,69              |
| 70           | 13,00              | 0,26              | 0,03              | 36,76              | 1,47              | 0,98              | 26,40              | 5,28              | 0,98              |
| 71           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 40,44              | 1,62              | 1,08              | 27,00              | 5,40              | 1,00              |
| 72           | 10,00              | 0,20              | 0,03              | 37,28              | 1,49              | 0,99              | 13,40              | 2,68              | 0,50              |
| 73           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 36,16              | 1,45              | 0,96              | 33,00              | 6,60              | 1,23              |
| 74           | 9,00               | 0,18              | 0,02              | 37,32              | 1,49              | 0,99              | 22,20              | 4,44              | 0,83              |
| 75           | 12,00              | 0,24              | 0,03              | 23,04              | 0,92              | 0,61              | 9,60               | 1,92              | 0,36              |
| <b>Média</b> | 9,80               | 0,20              | 0,03              | 33,80              | 1,35              | 0,90              | 18,69              | 3,74              | 0,70              |
| <b>SD</b>    | 1,96               | 0,04              | 0,01              | 5,37               | 0,22              | 0,14              | 6,85               | 1,37              | 0,25              |

<sup>a</sup>total de células; <sup>b</sup>total de células dividido por 50 (total de campos contados); <sup>c</sup>total de células dividido por 377 mm<sup>2</sup> (valor da área\* de medida); <sup>d</sup>total de células dividido por 25 (total de campos contados); <sup>e</sup>total de células dividido por 37,54 mm<sup>2</sup> (valor da área medida); <sup>f</sup>total de células dividido por 5 (total de campos contados); <sup>g</sup>total de células dividido por 26,88 (valor da área medida).

\* calculado em função do aumento da objetiva, ocular e optovar.

**Tabela 12.** Número de células apoptóticas totais, por campo e por mm<sup>2</sup>, pelas técnicas de HE e TUNEL, e proliferação celular (PCNA), nas 25 placentas das ratas do grupo diabético de 21 dias.

| Placentas    | Apoptose          |                   |                   |                    |                   |                   | PCNA               |                   |                   |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|              | HE                |                   |                   | Tunel              |                   |                   | Imuno-histoquímica |                   |                   |
|              | no.               | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   | no.                | Campo             | mm <sup>2</sup>   |
| 76           | 4,00 <sup>a</sup> | 0,08 <sup>b</sup> | 0,01 <sup>c</sup> | 12,36 <sup>a</sup> | 0,49 <sup>d</sup> | 0,33 <sup>e</sup> | 7,00 <sup>a</sup>  | 1,40 <sup>f</sup> | 0,26 <sup>g</sup> |
| 77           | 2,00              | 0,04              | 0,01              | 17,40              | 0,70              | 0,46              | 8,40               | 1,68              | 0,31              |
| 78           | 3,00              | 0,06              | 0,01              | 13,32              | 0,53              | 0,35              | 8,40               | 1,68              | 0,31              |
| 79           | 5,00              | 0,10              | 0,01              | 11,04              | 0,44              | 0,29              | 12,60              | 2,52              | 0,47              |
| 80           | 6,00              | 0,12              | 0,02              | 15,44              | 0,62              | 0,41              | 6,00               | 1,20              | 0,22              |
| 81           | 3,00              | 0,06              | 0,01              | 13,12              | 0,52              | 0,35              | 8,80               | 1,76              | 0,33              |
| 82           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 17,36              | 0,69              | 0,46              | 4,40               | 0,88              | 0,16              |
| 83           | 2,00              | 0,04              | 0,01              | 18,40              | 0,74              | 0,49              | 5,60               | 1,12              | 0,21              |
| 84           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 10,52              | 0,42              | 0,28              | 10,20              | 2,04              | 0,38              |
| 85           | 5,00              | 0,10              | 0,01              | 8,60               | 0,34              | 0,23              | 12,20              | 2,44              | 0,45              |
| 86           | 6,00              | 0,12              | 0,02              | 15,20              | 0,61              | 0,40              | 6,20               | 1,24              | 0,23              |
| 87           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 19,04              | 0,76              | 0,51              | 5,80               | 1,16              | 0,22              |
| 88           | 5,00              | 0,10              | 0,01              | 18,40              | 0,74              | 0,49              | 13,00              | 2,60              | 0,48              |
| 89           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 13,32              | 0,53              | 0,35              | 5,80               | 1,16              | 0,22              |
| 90           | 5,00              | 0,10              | 0,01              | 9,56               | 0,38              | 0,25              | 5,60               | 1,12              | 0,21              |
| 91           | 2,00              | 0,04              | 0,01              | 10,84              | 0,43              | 0,29              | 6,20               | 1,24              | 0,23              |
| 92           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 17,04              | 0,68              | 0,45              | 6,00               | 1,20              | 0,22              |
| 93           | 2,00              | 0,04              | 0,01              | 10,24              | 0,41              | 0,27              | 8,20               | 1,64              | 0,31              |
| 94           | 4,00              | 0,08              | 0,01              | 22,32              | 0,89              | 0,59              | 10,40              | 2,08              | 0,39              |
| 95           | 6,00              | 0,12              | 0,02              | 19,88              | 0,80              | 0,53              | 8,40               | 1,68              | 0,31              |
| 96           | 3,00              | 0,06              | 0,01              | 12,00              | 0,48              | 0,32              | 5,80               | 1,16              | 0,22              |
| 97           | 2,00              | 0,04              | 0,02              | 12,88              | 0,52              | 0,34              | 8,20               | 1,64              | 0,31              |
| 98           | 6,00              | 0,12              | 0,02              | 12,64              | 0,51              | 0,34              | 4,40               | 0,88              | 0,16              |
| 99           | 6,00              | 0,12              | 0,02              | 10,64              | 0,43              | 0,28              | 5,20               | 1,04              | 0,19              |
| 100          | 8,00              | 0,16              | 0,02              | 9,56               | 0,38              | 0,25              | 6,20               | 1,24              | 0,23              |
| <b>Média</b> | 4,20              | 0,08              | 0,01              | 14,04              | 0,56              | 0,37              | 7,56               | 1,51              | 0,28              |
| <b>SD</b>    | 1,61              | 0,03              | 0,004             | 3,76               | 0,15              | 0,10              | 2,49               | 0,50              | 0,09              |

<sup>a</sup> total de células; <sup>b</sup> total de células dividido por 50 (total de campos contados); <sup>c</sup> total de células dividido por 377 mm<sup>2</sup> (valor da área\* de medida); <sup>d</sup> total de células dividido por 25 (total de campos contados); <sup>e</sup> total de células dividido por 37,54 mm<sup>2</sup> (valor da área medida); <sup>f</sup> total de células dividido por 5 (total de campos contados); <sup>g</sup> total de células dividido por 26,88 (valor da área medida).

\* calculado em função do aumento da objetiva, ocular e optovar.

**Tabela 13.** Índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) em mm<sup>2</sup> de recém-nascidos (RN) PIP N-PIP das 5 ratas do grupo controle de 18 dias.

| Ratas        | Placentas | Classificação<br>do RN | PCNA | PIP  | N-PIP | TUNEL | PIP  | N-PIP |
|--------------|-----------|------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|
| 1            | 1         | AIP                    | 0,81 | 0,54 | 0,81  | 0,57  | 0,81 | 0,57  |
| 2            | 1         | AIP                    | 0,63 | 1,08 | 0,63  | 0,66  | 0,91 | 0,66  |
| 3            | 1         | AIP                    | 0,64 | 0,51 | 0,64  | 0,72  | 0,91 | 0,72  |
| 4            | 1         | AIP                    | 0,66 |      | 0,66  | 1,00  |      | 1,00  |
| 5            | 1         | AIP                    | 0,86 |      | 0,86  | 0,94  |      | 0,94  |
| 6            | 2         | PIP                    | 0,54 |      | 0,36  | 0,81  |      | 0,91  |
| 7            | 2         | AIP                    | 0,36 |      | 1,00  | 0,91  |      | 0,87  |
| 8            | 2         | AIP                    | 1,00 |      | 0,63  | 0,87  |      | 0,91  |
| 9            | 2         | PIP                    | 1,08 |      | 0,68  | 0,91  |      | 1,07  |
| 10           | 2         | AIP                    | 0,63 |      | 0,59  | 0,91  |      | 0,95  |
| 11           | 3         | AIP                    | 0,68 |      | 0,68  | 1,07  |      | 1,00  |
| 12           | 3         | AIP                    | 0,59 |      | 0,51  | 0,95  |      | 1,12  |
| 13           | 3         | AIP                    | 0,68 |      | 0,66  | 1,00  |      | 0,75  |
| 14           | 3         | GIP                    | 0,72 |      | 0,38  | 0,96  |      | 0,88  |
| 15           | 3         | GIP                    | 0,90 |      | 0,48  | 1,00  |      | 0,75  |
| 16           | 4         | GIP                    | 1,15 |      | 0,21  | 0,87  |      | 1,04  |
| 17           | 4         | AIP                    | 0,51 |      | 0,29  | 1,12  |      | 1,11  |
| 18           | 4         | AIP                    | 0,66 |      | 0,72  | 0,75  |      | 0,98  |
| 19           | 4         | AIP                    | 0,38 |      | 0,90  | 0,88  |      | 0,96  |
| 20           | 4         | AIP                    | 0,48 |      | 1,15  | 0,75  |      | 1,00  |
| 21           | 5         | GIP                    | 0,25 |      | 0,25  | 1,15  |      | 0,87  |
| 22           | 5         | AIP                    | 0,21 |      | 0,26  | 1,04  |      | 1,15  |
| 23           | 5         | AIP                    | 0,29 |      |       | 1,11  |      |       |
| 24           | 5         | PIP                    | 0,51 |      |       | 0,91  |      |       |
| 25           | 5         | AIP                    | 0,26 |      |       | 0,98  |      |       |
| <b>Média</b> |           |                        |      | 0,71 | 0,61  |       | 0,88 | 0,92  |
| <b>SD</b>    |           |                        |      | 0,32 | 0,25  |       | 0,06 | 0,15  |

IP= Índice placentário; PIP = Peso pequeno para a idade de prenhez; N-PIP = Pesos adequados e grandes para a idade de prenhez.

**Tabela 14.** Índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) em mm<sup>2</sup> de recém-nascidos (RN) PIP e N-PIP das 5 ratas do grupo controle de 21 dias.

| Ratas        | Placentas | Classificação<br>do RN | PCNA | PIP  | N-PIP | TUNEL | PIP  | N-PIP |
|--------------|-----------|------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|
| 26           | 6         | AIP                    | 0,52 | 0,72 | 0,52  | 0,68  | 0,8  | 0,68  |
| 27           | 6         | PIP                    | 0,72 | 0,92 | 0,78  | 0,75  | 0,9  | 0,84  |
| 28           | 6         | AIP                    | 0,78 |      | 0,31  | 0,84  |      | 0,95  |
| 29           | 6         | AIP                    | 0,31 |      | 0,86  | 0,95  |      | 1,06  |
| 30           | 6         | AIP                    | 0,74 |      | 0,85  | 1,06  |      | 1,13  |
| 31           | 7         | GIP                    | 0,86 |      | 0,88  | 1,08  |      | 1,04  |
| 32           | 7         | AIP                    | 0,85 |      | 0,33  | 1,13  |      | 1,06  |
| 33           | 7         | PIP                    | 0,92 |      | 0,77  | 0,93  |      | 1,09  |
| 34           | 7         | AIP                    | 0,88 |      | 1,06  | 1,04  |      | 0,95  |
| 35           | 7         | GIP                    | 0,91 |      | 0,58  | 0,88  |      | 1,12  |
| 36           | 8         | AIP                    | 0,33 |      | 0,89  | 1,06  |      | 0,78  |
| 37           | 8         | AIP                    | 0,77 |      | 0,54  | 1,09  |      | 0,97  |
| 38           | 8         | GIP                    | 0,92 |      | 0,98  | 1,14  |      | 0,97  |
| 39           | 8         | AIP                    | 1,06 |      | 0,54  | 0,95  |      | 0,59  |
| 40           | 8         | AIP                    | 0,58 |      | 0,96  | 1,12  |      | 0,76  |
| 41           | 9         | AIP                    | 0,89 |      | 0,44  | 0,78  |      | 0,87  |
| 42           | 9         | AIP                    | 0,54 |      | 0,88  | 0,97  |      | 1,13  |
| 43           | 9         | AIP                    | 0,98 |      | 0,70  | 0,97  |      | 0,72  |
| 44           | 9         | AIP                    | 0,54 |      | 0,48  | 0,59  |      | 0,68  |
| 45           | 9         | AIP                    | 0,96 |      | 0,86  | 0,76  |      | 1,08  |
| 46           | 10        | AIP                    | 0,44 |      | 0,91  | 0,87  |      | 0,88  |
| 47           | 10        | GIP                    | 0,66 |      | 0,92  | 0,98  |      | 1,14  |
| 48           | 10        | AIP                    | 0,88 |      | 0,66  | 1,13  |      | 0,98  |
| 49           | 10        | AIP                    | 0,7  |      |       | 0,72  |      |       |
| 50           | 10        | AIP                    | 0,48 |      |       | 0,68  |      |       |
| <b>Média</b> |           |                        |      | 0,82 | 0,73  |       | 0,84 | 0,93  |
| <b>SD</b>    |           |                        |      | 0,14 | 0,22  |       | 0,13 | 0,17  |

RN = Recém-nascido; IP = Índice placentário; PIP = Peso pequeno para a idade de prenhez; NPIP= Pesos adequados e grandes para a idade de prenhez.

**Tabela 15.** Índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) em mm<sup>2</sup> de recém-nascidos (RN) PIP e N-PIP das 5 ratas do grupo diabético de 18 dias.

| Classificação |           |       |      |      |       |       |      |       |  |
|---------------|-----------|-------|------|------|-------|-------|------|-------|--|
| Ratas         | Placentas | do RN | PCNA | PIP  | N-PIP | TUNEL | PIP  | N-PIP |  |
| 51            | 11        | AIP   | 0,42 | 0,75 | 0,42  | 0,66  | 0,62 | 0,66  |  |
| 52            | 11        | PIP   | 0,75 | 1,00 | 0,24  | 0,62  | 0,96 | 0,61  |  |
| 53            | 11        | PIP   | 1,00 | 0,57 | 0,65  | 0,96  | 0,91 | 1,00  |  |
| 54            | 11        | PIP   | 0,57 | 0,75 | 1,01  | 0,91  | 1,03 | 1,02  |  |
| 55            | 11        | PIP   | 0,75 | 0,28 | 0,73  | 1,03  | 1,07 | 0,79  |  |
| 56            | 12        | AIP   | 0,24 | 0,48 | 0,72  | 0,61  | 0,96 | 0,89  |  |
| 57            | 12        | AIP   | 0,65 | 0,39 | 0,84  | 1,00  | 0,97 | 0,82  |  |
| 58            | 12        | PIP   | 0,28 | 0,93 | 0,66  | 1,07  | 0,83 | 0,86  |  |
| 59            | 12        | AIP   | 1,01 | 0,83 | 0,83  | 1,02  | 0,96 | 0,99  |  |
| 60            | 12        | PIP   | 0,48 | 0,55 |       | 0,96  | 1,03 |       |  |
| 61            | 13        | AIP   | 0,73 | 0,69 |       | 0,79  | 0,91 |       |  |
| 62            | 13        | AIP   | 0,72 | 0,98 |       | 0,89  | 0,98 |       |  |
| 63            | 13        | AIP   | 0,84 | 1,00 |       | 0,82  | 1,08 |       |  |
| 64            | 13        | PIP   | 0,39 | 0,50 |       | 0,97  | 0,99 |       |  |
| 65            | 13        | AIP   | 0,66 | 1,23 |       | 0,86  | 0,96 |       |  |
| 66            | 14        | PIP   | 0,93 | 0,36 |       | 0,83  | 0,61 |       |  |
| 67            | 14        | PIP   | 0,83 |      |       | 0,96  |      |       |  |
| 68            | 14        | PIP   | 0,55 |      |       | 1,03  |      |       |  |
| 69            | 14        | PIP   | 0,69 |      |       | 0,91  |      |       |  |
| 70            | 14        | PIP   | 0,98 |      |       | 0,98  |      |       |  |
| 71            | 15        | PIP   | 1,00 |      |       | 1,08  |      |       |  |
| 72            | 15        | PIP   | 0,50 |      |       | 0,99  |      |       |  |
| 73            | 15        | PIP   | 1,23 |      |       | 0,96  |      |       |  |
| 74            | 15        | AIP   | 0,83 |      |       | 0,99  |      |       |  |
| 75            | 15        | PIP   | 0,36 |      |       | 0,61  |      |       |  |
| Média         |           |       |      | 0,71 | 0,68  |       | 0,93 | 0,85  |  |
| SD            |           |       |      | 0,27 | 0,23  |       | 0,14 | 0,15  |  |

IP = Índice placentário; PIP = Peso pequeno para a idade de prenhez; N-PIP= Pesos adequados e grandes para a idade de prenhez.

**Tabela 16.** Índices de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) em mm<sup>2</sup> de recém-nascidos (PIP) das 5 ratas do grupo diabético de 21 dias.

| Ratas        | Placentas | Classificação<br>do RN | PCNA | PIP  | TUNEL | PIP  |
|--------------|-----------|------------------------|------|------|-------|------|
| 76           | 16        | PIP                    | 0,31 | 0,26 | 0,33  | 0,33 |
| 77           | 16        | PIP                    | 0,31 | 0,31 | 0,46  | 0,46 |
| 78           | 16        | PIP                    | 0,47 | 0,31 | 0,35  | 0,35 |
| 79           | 16        | PIP                    | 0,22 | 0,47 | 0,29  | 0,29 |
| 80           | 16        | PIP                    | 0,33 | 0,22 | 0,41  | 0,41 |
| 81           | 17        | PIP                    | 0,16 | 0,33 | 0,35  | 0,35 |
| 82           | 17        | PIP                    | 0,21 | 0,16 | 0,46  | 0,46 |
| 83           | 17        | PIP                    | 0,38 | 0,21 | 0,49  | 0,49 |
| 84           | 17        | PIP                    | 0,45 | 0,38 | 0,28  | 0,28 |
| 85           | 17        | PIP                    | 0,23 | 0,45 | 0,23  | 0,23 |
| 86           | 18        | PIP                    | 0,22 | 0,23 | 0,4   | 0,4  |
| 87           | 18        | PIP                    | 0,48 | 0,22 | 0,51  | 0,51 |
| 88           | 18        | PIP                    | 0,22 | 0,48 | 0,49  | 0,49 |
| 89           | 18        | PIP                    | 0,21 | 0,22 | 0,35  | 0,35 |
| 90           | 18        | PIP                    | 0,23 | 0,21 | 0,25  | 0,25 |
| 91           | 19        | PIP                    | 0,22 | 0,23 | 0,29  | 0,29 |
| 92           | 19        | PIP                    | 0,31 | 0,22 | 0,45  | 0,45 |
| 93           | 19        | PIP                    | 0,39 | 0,31 | 0,27  | 0,27 |
| 94           | 19        | PIP                    | 0,31 | 0,39 | 0,59  | 0,59 |
| 95           | 19        | PIP                    | 0,22 | 0,31 | 0,53  | 0,53 |
| 96           | 20        | PIP                    | 0,31 | 0,22 | 0,32  | 0,32 |
| 97           | 20        | PIP                    | 0,16 | 0,31 | 0,34  | 0,34 |
| 98           | 20        | PIP                    | 0,19 | 0,16 | 0,34  | 0,34 |
| 99           | 20        | PIP                    | 0,23 | 0,19 | 0,28  | 0,28 |
| 100          | 20        | PIP                    |      | 0,23 | 0,25  | 0,25 |
| <b>Média</b> |           |                        |      | 0,28 |       | 0,37 |
| <b>SD</b>    |           |                        |      | 0,09 |       | 0,10 |

RN = Recém-nascido; IP = Índice placentário; PIP = Peso pequeno para a idade de prenhez.