

MICHELE MENDONÇA CARDOZO

**PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA
OBTENÇÃO DE DECIDUOMA EM RATAS
(*Rattus norvegicus*, var, Wistar)**

Monografia apresentada à Disciplina BC 013 –
Estágio em Biologia Celular, do Departamento
de Biologia Celular, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a obtenção do
Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio de Paula Soares
Greca

**CURITIBA
2002**

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

Ao Prof Dr. Cláudio de Paula Soares Greca (Departamento de Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná -UFPR) e à Prof^a Dr^a Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade (Departamento de Biologia Geral, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL) pela orientação assídua e profissional, além das sugestões.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular.

Aos Colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biologia do Endométrio de Roedores.

Aos colegas do Curso de Biologia da UFPR.

Aos meus pais Léa Vilma Schulze e Raphael Mendonça Cardozo, minha filha Manueia Mendonça Cardozo Ribeiro e meu irmão Dr. Maurício Mendonça Cardozo pelos momentos de alegria e dor.

Aos meus amigos e todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para que este trabalho alcançasse sucesso.

SUMÁRIO

RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. DECÍDUA	2
2.2. DECIDUOMA	3
2.2.1. Estímulos Artificiais	3
2.3. MORFOLOGIA GERAL DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA	5
2.4. O CICLO ESTRAL EM ROEDORES	6
2.4.1. Proestro	7
2.4.1.1. Histologia vaginal e genitália externa	8
2.4.1.2. Útero, ovários e ovidutos	8
2.4.2. Estro	9
2.4.2.1. Histologia vaginal e genitália externa	9
2.4.2.2. Útero, ovários e ovidutos	9
2.4.3. Metaestro	11
2.4.3.1. Histologia vaginal e genitália externa	11
2.4.3.2. Útero, ovários e ovidutos	12
2.4.4. Diestro	12
2.4.4.1. Histologia vaginal e genitália externa	12
2.4.4.2. Útero, ovários e ovidutos	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. RATOS	15
4.1.1. Vasectomia	15
4.2. RATAS	16
4.2.1. Divisão dos Grupos Experimentais	16
4.2.1.1. Grupo A	17
4.2.1.2. Grupo B	17
4.2.2. Determinação das Fases do Ciclo Estral	17
4.2.3. Indução da Pseudogestação	19
4.2.3.1. Grupo A	19

...

4.2.3.2. Grupo B	20
4.2.4. Indução da decidualização	20
4.3. COLETA DO MATERIAL	21
5. RESULTADOS E DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	23
5.1. DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL	23
5.1.1. Fase de Proestro	23
5.1.2. Fase de Estro	24
5.1.3. Fase de Metaestro	24
5.1.4. Fase de Diestro	25
5.2. INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO	25
5.3. VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA PSEUDOGESTAÇÃO	26
5.4. INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO	27
5.4.1. Injeção do Agente Indutor	27
5.5. COLETA DO MATERIAL	29
5.6. PREPARAÇÃO PARA A PESAGEM DO MATERIAL	29
5.7. PESOS OBTIDOS	29
5.7.1. Grupo "A" : Método do Cotonete	30
5.7.2. Grupo "B" : Método com Machos Vasectomizados	31
5.8. PREPARAÇÃO PARA A MICROSCOPIA DE LUZ	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

A decidualização de roedores têm despertado a curiosidade de muitos investigadores, não somente pelas marcantes modificações que ocorrem no endométrio, mas também pelo fato de que este fenômeno pode ser artificialmente induzido em animais pseudogravidos, através de diferentes estímulos, simulando a presença de um embrião durante a janela de implantação. O resultado desse procedimento, é o surgimento de uma estrutura semelhante à decídua, denominada deciduoma. Dentre os estímulos mais utilizados, podemos mencionar a aplicação, em endométrio hormonalmente sensibilizado com estrógeno e progesterona, de lesões mecânicas e, de injeção no lúmen uterino, de solução salina, polissacarídeos e óleos. O objetivo principal deste estudo teve a finalidade de determinar e otimizar um melhor procedimento para obtenção de deciduomas em ratas, uma vez que este modelo experimental é amplamente utilizado na rotina do nosso laboratório. Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar procedentes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com idade de aproximadamente três meses. Os animais foram mantidos em salas com períodos controlados de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura (24°C), recebendo água e ração ad libitum. O controle do ciclo estral foi feito através de esfregaços vaginais pela manhã, os quais foram corados com Shorr. Uma vez detectada a fase estro, no mesmo dia à tarde, realizou-se a indução da pseudogestação utilizando-se estímulo mecânico endocervical com cotonete (Método Cotonete). A partir desta estimulação, considerou-se este dia como 1ºDPG (Dia de Pseudogestação). No 5ºDPG, os grupos de ratas pseudogravidas foram induzidas à decidualização através da injeção de óleo na junção útero-tubal. Utilizaram-se quantidades iguais (70µL em cada corno uterino) de três variedades de óleo: oliva, araquis e amêndoa. No 8ºDPG, os animais foram sacrificados e seus cornos uterinos e ovários coletados, pesados e fixados em Metacan. De forma geral, todos os óleos promovem resposta no endométrio, com o surgimento de sítios de decidualização com maior ou menor desenvolvimento, dependendo do tipo de óleo injetado. Comparando úteros equivalentes de cada grupo, verificamos que a indução da decidualização com óleo de amêndoas, foi o que apresentou os melhores resultados, com a melhor reação decidual, extensos sítios de decidualização e marcante desenvolvimento das regiões que compõem a porção antimesometrial do útero.

1. INTRODUÇÃO

A decidualização de roedores têm despertado a curiosidade de muitos investigadores, não somente pelas marcantes modificações que ocorrem no endométrio, mas também pelo fato de que este fenômeno pode ser artificialmente induzido em animais pseudográvidos, através de diferentes estímulos, simulando a presença de um embrião durante a janela de implantação (ABRAHAMSOHN et. al., 1993; ANDRADE et. al., 1996). O resultado da indução da decidualização é o surgimento de uma estrutura semelhante à decídua, denominada decíduoma.

Dentre os estímulos mais utilizados, podemos mencionar a aplicação, em endométrio hormonalmente sensibilizado com estrógeno e progesterona, de lesões mecânicas e de injeção no lúmen uterino, de solução salina, de polissacarídeos e de óleos de origem vegetal (tais como oliva, araquis e amêndoa).

O objetivo principal deste estudo foi, após levantar as principais metodologias utilizadas na literatura pertinente, padronizar e principalmente otimizar um melhor procedimento para obtenção de decíduomas em ratas para o nosso laboratório. A padronização do protocolo foi desenvolvida em várias etapas: 1) otimização da determinação do ciclo estral em ratas nas condições do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR; 2) Definição do 1º DPG (Dia de Pseudo-Gestação), através da verificação da presença ou não de rolha vaginal e também da análise de esfregaços vaginais característicos para reconhecimento do estado fisiológico pseudográvido; 3) Indução da pseudogestação, comparando-se dois métodos alternativos: o coito de ratas com machos vasectomizados e estimulação da cérvix uterina com cotonete e; 4) Indução da decidualização e obtenção do decíduoma após a injeção de três variedades de óleos vegetais purificados (oliva, araquis e amêndoa) e de solução PBS, além dos animais-controle. A padronização da metodologia foi de suma importância para determinar qual destes conjuntos de variáveis proporciona melhores resultados, uma vez que este modelo experimental é amplamente utilizado na rotina do nosso laboratório.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A implantação de embriões na mucosa uterina dos mamíferos é uma etapa crítica da gestação, pois o desenvolvimento normal do embrião depende de um estreito contato entre os tecidos materno e fetal, o que a torna, em condições fisiológicas, um raro exemplo de interação entre tecidos de organismos geneticamente diferentes. O período de início da gestação é, portanto, objeto de estudo que desperta grande interesse dos pesquisadores de várias áreas do conhecimento (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993).

2.1. DECÍDUA

Na maioria dos mamíferos, a partir do momento em que o embrião entra em contato com o epitélio uterino, inicia-se uma marcante e gradual modificação do tecido conjuntivo frouxo que forma o estroma endometrial. Esta modificação é caracterizada pela transformação de uma população especial de células morfológicamente reconhecidas como fibroblastos endometriais, em células que adquirem características fenotípicas de células epiteliais, as quais são poliédricas, volumosas e polinucleadas, passando a ser denominadas células decíduais (FINN, 1977). O processo que envolve tal transformação celular é denominado reação decidual ou decidualização (De FEO, 1967; FINN & PORTER, 1975).

A decidualização promove marcantes modificações, de forma que o endométrio passa a exibir características de um tecido com arquitetura semelhante ao parênquima hepático (KREHBIEL, 1937), originando-se uma nova estrutura denominada decídua (FINN, 1977). O processo é dinâmico, ocorrendo dentro de um espaço de tempo geneticamente pré-estabelecido e notavelmente curto, durante o qual os fibroblastos endometriais adquirem progressivamente novas características morfofuncionais, dependentes da ação de hormônios sexuais.

No processo há uma considerável proliferação celular que antecede a implantação do blastocisto (FINN & MARTIN, 1967; LOBEL *et al.*, 1967). A hipertrofia e hiperplasia das células decíduais, promove uma marcante redução dos espaços intercelulares afetando conseqüentemente os componentes da matriz

extracelular, os quais são submetidos a um processo de remodelação (ZORN *et al.*, 1986; SOARES GRECA *et al.*, 2000; Muro, 2000).

A decidualização do endométrio ocorre em muitas espécies de mamíferos, incluindo os roedores e a espécie humana. Entretanto, para que a reação decidual se efetue, é necessário que o endométrio atinja um grau de receptividade ideal, o qual é obtido por ação de níveis precisos de hormônios sexuais, que devem atuar em uma seqüência adequada de estrógeno-progesterona-estrógeno (FINN, 1977). A reação decidual se estabelece quando estímulos apropriados são aplicados as células do epitélio que reveste a luz uterina. Em situação fisiológica natural, este estímulo é fornecido pelo embrião, que por sua vez deverá estar em uma etapa adequada de desenvolvimento para que a interação seja eficiente. Esta etapa da implantação foi definida por ABRAHAMSOHN & ZORN (1993), sendo denominada de Janela de Implantação (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). Caracteriza-se então uma situação especial que o sincronismo de desenvolvimento entre o endométrio e o embrião, é fundamental para o sucesso da implantação.

2.2. DECIDUOMA

Como mencionado na Introdução, a indução da decidualização pode ser artificialmente induzida em roedores pseudográvidos, através de diferentes estímulos, simulando a presença do embrião durante a Janela de Implantação (ANDRADE, 1993). Estes procedimentos promovem o surgimento de uma estrutura tissular semelhante à decídua, denominada Deciduoma (FINN, 1977).

2.2.1. Estímulos Artificiais

Dentre os estímulos artificiais mais utilizados, podemos mencionar a aplicação de lesões mecânicas no endométrio sensibilizado (De FEO, 1967) e a injeção no lúmen uterino de óleo de araquis (ANDRADE, 1993; ANDRADE *et al.* 1996) e polissacarídeos (FINN & KENN, 1963; De FEO, 1967). Outras substâncias também têm sido reconhecidas pela propriedade de disparar o processo de transformação endometrial, tais como prostaglandinas (SANANES *et al.*, 1976) e histamina (SHELESNYAK, 1952). O estudo do deciduoma é de grande interesse,

uma vez que ainda desconhece-se exatamente o papel desempenhado pelo blastocisto na decidualização, aceitando-se apenas o contato físico como indutor da decidualização.

2.3. MORFOLOGIA GERAL DA DECÍDUA E DECIDUOMA

No útero de roedores, particularmente em camundongas e ratas, formam-se duas áreas diametralmente distintas de decídua/deciduoma, que distinguem-se pelo desenvolvimento temporal, arranjo das células, algumas características morfológicas peculiares e destino das mesmas. A reação decidual (natural ou artificialmente induzida) se estabelece inicialmente na área antimesometrial do útero (ou seja, na área oposta à inserção do mesométrio na cavidade abdominal). A decídua/deciduoma antimesometrial, se desenvolve a partir da região imediatamente subjacente ao epitélio de revestimento da cripta uterina. Tal variedade de decídua/deciduoma surge nas camundongas a partir do 5º dia de gestação (DG) (ABRAHAMSOHN, 1983) e 6º DG nas ratas (ENDERS & SCHLAFKE, 1967). Em oposição, na área mesometrial do útero também estabelece-se uma reação decidual, porém com desenvolvimento tardio em relação à antimesometrial, a partir do 8º ou 9º DG (SNELL, 1941). Esta estrutura, na gestação natural, tem a finalidade de formar a porção materna da placenta, que nas ratas e camundongas é do tipo hemocorial (RUGH, 1968). Vale realçar que deciduoma também obedece os mesmos padrões observados na decídua, com exceção da ausência de formação placentária, uma vez que há ausência do embrião.

As regiões uterinas onde ocorre a decidualização são chamadas de sítios de implantação. No deciduoma, as regiões equivalentes são denominadas sítios de decidualização. Como referido anteriormente, a reação decidual na área antimesometrial, tanto na decídua como no deciduoma, desenvolve-se centrifugamente a partir do epitélio de revestimento uterino, e se estende de forma gradual até as imediações do miométrio, onde uma pequena região não-decidualizada é mantida durante toda a gestação e pseudogestação. As regiões situadas entre os sítios de implantação/decidualização são denominadas de sítios intermediários. Os equivalentes na Decídua denominam-se, sítios de interimplantação. O endométrio destes sítios não decidualiza e mantém as características de endométrio de animal não-grávido.

Tanto pelo ponto de vista natural como artificial, a decidualização apresenta um amplo e variado espectro de interesse do para estudos em biologia celular e tecidual. Neste sistema podem ser desenvolvidos diversos estudos, envolvendo os

diferentes fenômenos que participam da decidualização, tais como diferenciação celular, comportamento imunológico e expressão de receptores.

No que se refere especificamente a estudos relacionados ao decíduoma, vários autores tem procurado estabelecer modelos reprodutíveis de se obter tal estrutura tissular (De Feo, 1967; Andrade et al., 1993; Enders & Schlafke, 1967). Dentre estes modelos encontram-se informações descontinuadas e incompletas apenas sobre a indução no início do processo de pseudogestação (como o coito com ratos vasectomizados), como a indução e manutenção da decidualização (com óleos como o de oliva), os quais, até a finalização deste estudo, constituíam a metodologia de rotina adotada em nosso Laboratório. Graças aos resultados e a padronização obtidas nesta monografia, o Laboratório de Matriz Extracelular e Biologia do Endométrio de Roedores, pelo menos 02 dissertações de Mestrado, além de projetos de iniciação científica puderam ser melhor conduzidos.

Ainda neste contexto, durante o desenvolvimento deste projeto de monografia, foram testadas as metodologias que se supunham as mais adequadas para a indução do decíduoma, preocupando-se em confirmar os procedimentos realizados no Laboratório.

2.4. O CICLO ESTRAL EM ROEDORES

Podemos definir o ciclo estral como sendo um conjunto cíclico de modificações que se manifestam no trato reprodutor de fêmeas de alguns mamíferos, tais como cães, gatos, coelhos, bovinos e roedores (especialmente camundongos e ratos). Estas modificações são periódicas e estão relacionadas à atividade sexual das fêmeas (assim como para as mulheres há o ciclo menstrual).

Há várias formas de detecção e observação de indícios que demonstram tais modificações, tanto a nível tecidual e celular (no útero, ovário e conteúdo vaginal), quanto a nível comportamental dos animais.

A determinação das fases do ciclo estral é temporalmente definida em horas. Todavia, fatores diversos como luminosidade, temperatura, alimentação, alojamento, ruído excessivo, odores fortes, além de outros como doenças, podem afetar o ciclo dos animais.

Podemos classificar os animais de acordo com a quantidade de ciclos que apresentam. Neste sentido, alguns animais apresentam apenas um ciclo por ano. São ditos **monoestros**. Por outro lado, animais que apresentam vários ciclos anuais, são ditos **poliestros**, como é o caso de camundongas e do modelo de estudo do nosso trabalho, as ratas.

O método de diagnóstico mais utilizado para detectar uma determinada fase do ciclo estral, foi descrito primeiramente por STOCKARD & PAPANICOLAU, em 1917, que conciliava sinais externos com o exame histológico do conteúdo celular do fluído vaginal (GUAZZELLI, 1982).

A vantagem deste método reside no fato de que se pode estudar as modificações que ocorrem no animal, sem a necessidade do sacrifício deste, sendo amplamente utilizado nos estudos relacionados à Biologia da Reprodução.

Segundo BRONSON et. al. (1966) e GUAZZELLI (1982), as mudanças do ciclo são acompanhadas por mudanças hormonais especiais que serão descritas a seguir.

Há uma vasta literatura que descreve o ciclo de camundongas. Isto talvez seja explicado pelo fato de que tal espécie de roedor seja um modelo animal mais utilizado. Contudo, quando se trata de descrições sobre o ciclo estral de ratas, denota-se que a literatura é bem mais escassa, fazendo-se necessário relatarmos sobre o assunto.

De acordo com a escassa literatura pertinente, o ciclo estral, em ratas transcorre por um período de 05 dias, sendo dividido em pelo menos 4 etapas. Estas fases são classificadas em caráter didático, com base principal na análise microscópica de esfregaços vaginais. Como que não há delimitação específica entre as fases (como início de uma e término da outra). Neste sentido, torna-se importante acrescentar observações referentes ao estado fisiológico de órgão como o útero e os ovários.

2.4.1. Proestro

Esta é uma fase anabólica (preparatória e construtiva, que em ratas dura aproximadamente 12 horas), em que há um crescimento ativo e progressivo das

mucosas do trato reprodutor feminino. Dentre algumas características principais podemos mencionar:

- aumento no número de células e na espessura da camada epitelial da mucosa uterina;
- aumento em número e diâmetro dos capilares;
- início da atividade das glândulas uterinas;
- crescimento do folículo de Graaf;
- secreção aumentada de estradiol e pouca progesterona;
- crescimento e início da maturação dos novos ovócitos nos ovários.

2.4.1.1 Histologia vaginal e genitália externa

De acordo com JUNQUEIRA & CARNEIRO (1999), o epitélio vaginal apresenta várias camadas de células (de 10 a 13), sendo que as camadas 4 a 5 são as mais exteriores, contendo ainda células nucleadas. Há uma grande atividade mitótica e não são encontrados leucócitos.

Acima destas, há uma camada denominada granulosa, mostrando um sinais de aumento da cornificação. Estas células cornificadas possuem citoplasma fino e dobrado (o que também conhecido como *forma navicular*).

O orifício vaginal está dilatado e os tecidos genitais externos encontram-se edemaciados e com tonalidade rosada ou avermelhada.

2.4.1.2. Útero, ovários e oviduto

É comum observar nestes órgãos sinais de hiperemia (fluxo sanguíneo aumentado) e certa distensão do útero.

No epitélio uterino detecta-se grande atividade mitótica. Nos ovários encontram-se folículos amplos e distendidos com considerável líquido folicular. Há pouca atividade mitótica no epitélio germinativo e nas células foliculares.

2.4.2. Estro

Da mesma forma que na fase anterior, o estro corresponde a um período anabólico. A duração desta fase para ratas é de aproximadamente 24 horas. É o período propício para o acasalamento, uma vez que as fêmeas tornam-se receptivas ao acasalamento, em virtude do evento da ovulação. Na linguagem leiga esta fase é conhecida com pelo termo cio.

2.4.2.1. Histologia vaginal e genitália externa

No que se refere ao epitélio vaginal, agora com aproximadamente 12 camadas celulares, a camada superficial nucleada é perdida, de forma que restam células cornificadas. Nos esfregaços vaginais, tais células se tornam muito bem evidenciadas quando se aplica coloração pelo método Shorr. Ainda em se tratando do epitélio vaginal, encontram-se abaixo das cornificadas as células epiteliais basais, que, nesta fase não aparecem no esfregaço.

Dentre outras características importantes, observa-se tanto uma marcante redução da atividade mitótica epitelial, como ausência de leucócitos.

Os tecidos genitais podem se apresentar edemaciados, bem como dilatação do orifício vaginal, além de que a mucosa vaginal apresenta-se seca.

2.4.2.2. Útero, ovários e oviduto

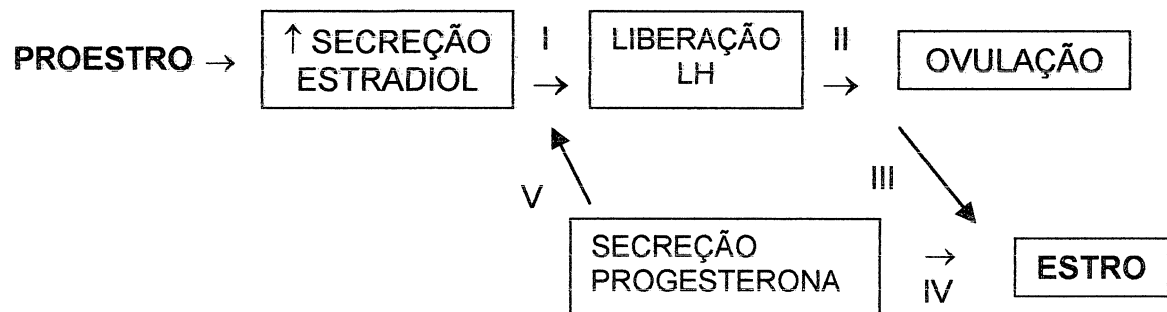
A distensão do útero e a atividade mitótica característica atingem seu máximo desenvolvimento. Em contraposição algumas características peculiares passam a se tornar evidentes, tais como:

- 1) congestionamento de sangue nos vasos uterinos e ovarianos;
- 2) segue-se a ovulação após distensão da extremidade superior do oviduto;
- 3) Há atividade mitótica no epitélio germinativo e nas células foliculares.

A maturação dos ovócitos e o crescimento folicular que se iniciou na fase anterior (incluindo a seqüência secreção de estradiol, desencadeando uma onda de

secreção de hormônio luteinizante) continua nesta fase, juntamente com o início da ovulação.

Estando o animal nesta fase do ciclo, é peculiar a observação de influência de um alto nível de estrógeno, seguido por um alto nível de progesterona, que fora iniciado no proestro.



Esquema A - Exigência hormonal para que ocorra a ovulação e a fase estro. (segundo GUAZZELLI, 1982.)

2.4.3. Metaestro

Em oposição às fases anteriores, o metaestro corresponde a um período catabólico, caracterizado por mudanças degenerativas no aparelho genital GUAZZELLI (1982) e BRONSON et. al. (1966). O período dura aproximadamente 12 horas (em ratas). Entretanto, segundo HARTMANN (1993), em relatos detalhados acerca do ciclo estral da linhagem de ratas estudadas, a delimitação das fases do ciclo em horas é aproximada, variando de animal para animal.

As características da fase de metaestro também são encontradas quando a fêmea encontra-se em pseudogestação, ou quando em período luteal, caso haja coincidência com a realização de acasalamento. Como já comentado, ocorrerá pseudogestação em virtude de estímulo mecânico, na cérvix uterina, ou ainda, como consequência do coito com um macho esterilizado por vasectomia.

No entanto, se houver cruzamento com macho fértil, com consequente implantação embrionária, o corpo lúteo torna-se funcional, se desenvolvendo a partir de um folículo ovulado. Caso não haja fecundação, o corpo lúteo não está funcional, de forma que o organismo passa a depender do tecido ovariano intersticial para manter níveis hormonais adequados.

O tecido ovariano intersticial, por se tratar de um tecido glandular, possui a capacidade de secreção de quantidades consideráveis de progesterona como resposta ao estímulo da gonadotrofina hipofisária, o hormônio luteinizante.

Ainda dentro das características comportamentais do animal, com o estabelecimento do corpo lúteo, a fêmea torna-se indiferente e foge do assédio do rato macho.

2.4.3.1. Histologia vaginal e genitália externa

Nas características apresentadas nos esfregaços vaginais, constata-se que fase inicial do metaestro ainda é possível detectar uma camada de células cornificadas, sendo que após aparecem de 4 a 7 camadas de células epiteliais infiltradas com leucócitos. A infiltração se inicia abaixo do epitélio e depois progride sobre as camadas deste. O esfregaço vaginal apresenta ainda algumas células epiteliais anucleadas, geralmente agrupadas e que se coram pelo Shorr. Ao longo

da fase surgem células epiteliais nucleadas, nas quais o citoplasma adquire coloração azulada. Há de se acrescentar que o fluido vaginal adquire aspecto pastoso, com coloração leitosa.

O período também é caracterizado como um início da regeneração do epitélio uterino. No início desta fase, a abertura vaginal encontra-se dilatada, podendo mostrar granulações e lúmen ainda seco. Com o tempo, os tecidos genitais externos se apresentam sem edema e a mucosa torna-se umidificada

2.4.3.2. Útero, ovários e ovidutos

Na mucosa uterina inicia-se uma degeneração do epitélio, enquanto que as mitoses rarificam. A distensão do órgão diminui, enquanto que os leucócitos começam a penetrar no epitélio. Como consequência o tecido se torna flácido e adquire mostras de degeneração.

Ao nível dos ovários, progride a ovulação, que iniciou-se na fase de estro anterior. Também se observam muitos folículos em atresia, bem como denota-se a presença de um corpo lúteo precoce e crescente.

Quando se estabelece um quadro de pseudogestação, as características podem perdurar por 10 dias. Na seqüência, a espessura da mucosa uterina vai diminuindo até readquirir as características do estado de proestro. No final, o corpo lúteo degenera e desaparece.

2.4.4. Diestro

Trata-se de um período importante, em que não há acasalamento. De acordo GUZZELLI (1982) é também chamado "fase de descanso sexual".

2.4.4.1. Histologia vaginal e genitália externa

Encontram-se no esfregaço vaginal, poucas células epiteliais, com citoplasma azulado. Algumas células apresentam vários estágios de degeneração nuclear. Há uma proliferação de leucócitos polimorfonucleados (PMNs).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

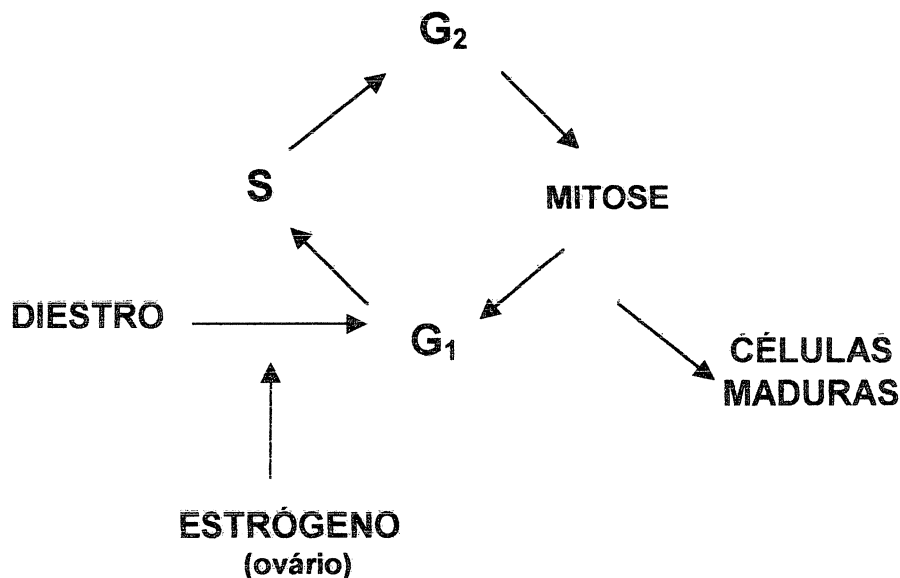
Em geral detecta-se a presença de muco. Contudo, em nossas observações, constatamos que tal manifestação nem sempre se faz presente.

A genitália externa apresenta-se sem edema. Ao contrário das demais fases, a abertura vaginal se encontra reduzida ou mesmo fechada. A mucosa vaginal mantém a umidificação e sua secreção torna-se viscosa.

2.4.4.2. Útero, ovários e ovidutos

No que se refere ao útero, relatos da literatura descrevem-no, nesta fase, com aspecto anêmico, de tamanho médio e flácido (GUAZZELLI, 1982; BRONSON et. al., 1966). O epitélio é saudável, mesmo com a proliferação de leucócitos. Denota-se ainda certa secreção nas glândulas uterinas.

Durante este período, a maioria do epitélio uterino adquire condições de sintetizar DNA e subseqüentemente, as células entram em mitose. Para que isso ocorra, há a necessidade de um certo nível de estrógeno para que se possibilite uma transição para a intérfase pré-sintética, com o intuito de uma futura síntese de DNA e consequente divisão celular.



Esquema B - Durante o diestro, a maioria das células estão na chamada fase G_0 (GUAZZELLI, 1982).

3. OBJETIVOS

Como pode ser constatado na revisão da literatura a Biologia da Reprodução têm estudado a decídua e o deciduoma de roedores em larga escala. O principal modelo animal são os roedores, pois além de fácil manuseio, possuem um ciclo reprodutivo relativamente curto, quando comparados aos outros grupos desta mesma classe.

Todavia, uma vez que os experimentos são realizados em instituições e países diferentes, existindo certa heterogeneidade na forma de obtenção das amostras deciduais e com resultados semelhantes, decidimos adequar os relatos da bibliografia à realidade de nosso laboratório, o qual não dispõe de muitos recursos e utiliza a decídua e o deciduoma como modelo experimental de sua linha de pesquisa.

Este trabalho tratou exclusivamente do modelo para a obtenção do deciduoma, visto ser um material mais delicado, que depende de muitos outros fatores.

Tomando por base esses fatos, a presente monografia teve os seguintes objetivos:

1. Realizar revisão bibliográfica para levantar e testar as principais metodologias utilizadas para a obtenção do deciduoma;
2. Comparar duas metodologias de indução de pseudogestação: com cotonetes e com ratos machos vasectomizados;
3. Determinar o 1º DPG (primeiro dia de pseudogestação);
4. Verificar e quantificar o aparecimento de Rolha Vaginal;
5. Determinar qual variedade de óleo vegetal apresenta melhores resultados como agente indutor da decidualização;
6. Estabelecer um modelo padrão para a obtenção de tal material em nosso laboratório;
7. Processar estes materiais para rotina de microscopia de luz e eletrônica, para serem utilizados por outros usuários do Laboratório.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. RATOS

Foram utilizados no total, 06 ratos machos adultos com três meses de idade (*Rattus norvegicus* var. Wistar), provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde receberam alimento (ração em *pelets*) e água *ad libitum*, sendo separados individualmente 1 rato/caixa (40cm X 25cm X 15cm). Os animais foram mantidos em salas que possuem temperatura controlada a 23 °C e controle de luminosidade (12 horas claro, 12 horas escuro – Ciclo Circadiano).

4.1.1. Vasectomia

Para a cirurgia de vasectomia, anestesiou-se o animal com éter etílico, seguido de tricotomia na região abdominal. O procedimento cirúrgico iniciou-se primeiramente na pele, sendo em seguida feita nova incisão bilateral nas camadas musculares inferiores. Nesta área fez-se uma incisão horizontal de aproximadamente 1,5 cm, a uma distância de cerca de 1,0 a 1,5cm acima da genitália externa.

Com o auxílio de uma pinça, exteriorizou-se o testículo, o epidídimo e o ducto deferente, sendo que este foi levemente estirado com o apoio de uma pinça curva média.

Foram suturadas as duas extremidades do canal, bilateralmente, numa distância média de 1,5cm. Em seguida, seccionou-se a parte intermediária (entre os dois nós de sutura) que resultou em um fragmento de 0,5cm a 0,7cm (para evitar uma possível anastomose). Para a assepsia do local utilizou-se PVPI (Polvidine).

Na seqüência, foram suturadas as camadas musculares internas e finalmente a pele do animal.

Cada rato operado permaneceu em caixa separada, por um período de repouso de 15 dias (tempo suficiente para a recuperação dos animais e cicatrização dos pontos).

Decorrido este período, no 16º dia, foram colocadas 2 ratas adultas (com três meses de idade -*Rattus norvegicus* var. Wistar, também provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná), em cada gaiola contendo um macho. As fêmeas permaneceram nestas condições por 21 dias (período de uma gestação), para a total eliminação de restos de líquido seminal, além da verificação da presença ou ausência de espermatozóides através de esfregaço vaginal (sempre às 7 horas da manhã). Os esfregaços foram realizados ao longo dos sete primeiros dias, para a certificação total do sucesso da cirurgia de vasectomia.

Uma vez detectado o sucesso da vasectomia, a partir do 37º dia pós-cirúrgico, tais ratos foram destinados ao plantel de ratos vasectomizados, cujo destino era efetuar o acasalamento com as ratas do grupo de estudo de pseudogestação.

As ratas (no total 06), que permaneceram com os machos vasectomizados, ficaram sob observação posterior por sete dias, sendo que também foram obtidos esfregaços vaginais diários e, uma vez constatado que estavam “ciclado” normalmente, foram utilizadas no plantel de ratas do grupo de estudo de pseudogestação.

4.2. RATAS

Foram utilizadas no total, 42 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus* var. Wistar), com cerca de três meses de idade, nulíparas, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde receberam alimento e água *ad libitum*.

As ratas foram separadas aleatoriamente em grupos de 05 animais/caixa (40cm X 25cm X 15cm) e alojadas em sala do Biotério, com sistema de controle de fotoperíodo (12 horas claro, 12 horas escuro), temperatura (23 °C) e umidade.

4.2.1. Divisão dos Grupos Experimentais

As ratas foram marcadas e divididas em GRUPO A e GRUPO B, para distinguir os tipos de indução da pseudogestação.

4.2.1.1. Grupo A

Neste grupo utilizamos a indução da pseudogestação, através do *método cotonete*.

Este é um método mecânico. A razão em se adotá-lo residiu no fato de o mesmo ser de fácil acesso e baixo custo, substituindo outros já conhecidos, tais como, métodos com bastão de vidro ou bolinhas de vidro, raspagem do útero, eletrochoque ou qualquer outro método que possuem custo maior.

4.2.1.2. Grupo B

Para estes animais, a indução da pseudogestação foi realizada através do plantel de ratos machos vasectomizados, cuja metodologia foi descrita no item 3.1.1.

4.2.2. Determinação das Fases do Ciclo Estral

Antes de iniciar os esfregaços vaginais, cada rata recebeu uma marcação com corante, para diferenciação e controle do experimento.

Diariamente, as ratas foram submetidas a metodologia de rotina utilizada para a determinação do ciclo estral.

A coleta dos esfregaços sempre se iniciava às 8h da manhã, com a utilização de cotonetes esterilizados (com o excesso de algodão retirado anteriormente) embebidos numa pequena quantidade de soro fisiológico 0,9%.

Escolhemos o uso de soro fisiológico para equacionar um problema freqüente apresentado pelos animais, que é o surgimento de reações inflamatórias constantes na mucosa vaginal, pelo manuseio diário. Tal procedimento teve como base as observações descritas por Hartmann (1993).

O cotonete era cuidadosamente inserido na cavidade vaginal da rata, girando-o totalmente apenas uma vez.

Ao ser retirado, o elemento colhido era espalhado (esfregaço) numa lâmina de microscopia, previamente identificada com a marcação da respectiva rata.

Esta lâmina era então acondicionada em cuba vertical para coloração.

Uma vez obtido o esfregaço, era necessário corá-lo.

Para tal utilizamos a metodologia de rotina Shorr, seguindo protocolo abaixo:

- 1) 5 minutos em solução álcool etílico 95%, éter etílico 5%;
- 2) 5 minutos em álcool 70%;
- 3) 5 minutos em álcool 50%;
- 4) lavagem em água de torneira;
- 5) lavagem em água destilada;
- 6) 3 minutos em Hematoxilina de Harris;
- 7) 5 minutos em água de torneira corrente para viragem;
- 8) lavagem com água destilada;
- 9) 6 minutos em Shorr;
- 10) lavagem em água de torneira até retirar o excesso de corante;
- 11) secagem ao ar livre;

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Olympus, para que detectar a fase do ciclo em que a rata se encontrava.

Todos os dados pertinentes foram anotados, tais como quantidades de: leucócitos, células epiteliais nucleadas e anucleadas (geralmente picnóricas) e presença de muco, quando houvesse.

Este controle foi feito diariamente, para se certificar de que ratas estavam realmente ciclando e determinar o tempo aproximado de cada ciclo, para posterior comparação com a literatura.

Com base nas anotações, padronizou-se a seguinte tabela para determinar os ciclos:

FASE DO CICLO	NUCLEADAS	ANUCLEADAS	LEUCÓCITOS	MUCO
PROESTRO	++ a +++	+	-	-
ESTRO	-	+++	-	-
METAESTRO	+	++ a +++	+	-
DIESTRO	+	+	++ a +++	+

TABELA 4.1 – Padronização do esfregaço vaginal, para determinação da fase do ciclo estral.

LEGENDAS:

NUCLEADAS: células nucleadas presentes na lâmina;

ANUCLEADAS: células anucleadas na lâmina;

LEUCÓCITOS: leucócitos presentes na lâmina;

OUTROS: presença ou não de muco.

(-) : ausência total na lâmina;

(+) : de 10 a 50 células na lâmina (pouco significativo) ;

(++) : mais de 50 células na lâmina (significativo);

(+++): quantidade excessiva na lâmina (bastante significativo)

4.2.3. Indução da Pseudogestação

Uma vez determinada a fase do ciclo em que a rata se encontrava, as na fase estro foram separadas e receberam aleatoriamente a indução por uma das duas metodologias.

4.2.3.1. Grupo A

No mesmo dia em que foi determinada a fase Estro, também foi determinado o 1º DPG (Dia de Pseudo-Gestação). Às 18 horas, as ratas foram submetidas à indução mecânica (endocervical) com cotonete umedecido com soro fisiológico.

Neste caso, utilizamos cotonetes em que o tufo de algodão não fosse excessivo, sendo que não foi retirado o excesso de algodão.

Segurando a rata firmemente, inserimos cuidadosamente o cotonete previamente umedecido na cavidade vaginal, com cerca de 1,2 cm a 1,5cm do bastão, até encostar no fundo do colo. Com movimentos delicados, repetimos a movimentação (simulando o coito do macho), sempre com movimentos giratórios, tendo o cuidado de não lesar a mucosa vaginal. Os movimentos giratórios eram de cerca de 180º para ambos os lados, sendo que este procedimento foi repetido 20 vezes em cada rata.

O número de estímulos foi determinado a partir de comunicação pessoal com o Prof. Dr. Paulo Alexandre Abrahamsohn (Laboratório de Biologia da Reprodução, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

A razão em se consultar o Prof. Paulo, se baseia no fato de que movimentos repetidos de 10 e 15 vezes, não alcançavam resultados satisfatórios. As ratas não

entravam em estado pseudográvido e, portanto, não decidualizavam. Estímulos com mais de 20 repetições, além de apresentarem a mesma dificuldade, promovia nos animais uma acentuada reação inflamatória na mucosa vaginal.

Uma vez a rata entrando em estado pseudográvido, nos dias seguintes foram obtidos novos esfregaços vaginais (sempre às 8 horas da manhã), para o acompanhamento e certificação da ocorrência de pseudogestação. Tais esfregaços foram realizados do 1º ao 5º DPG. Animais que apresentavam qualquer variação anormal ao procedimento, ou eram descartados, ou então mantidos em espera para serem novamente utilizados.

4.2.3.2. Grupo B

Uma vez diagnosticado a fase estro pelo esfregaço vaginal, ao menos duas ratas eram colocadas nas gaiolas dos macho vasectomizado, no horário das 18 horas, onde permaneceram durante a noite.

Na manhã seguinte, às 8 horas, as ratas eram colocadas em gaiola separada. Um dos sinais de acasalamento, a presença de rolha vaginal, era indicativo de início da pseudogestação. Para confirmação, uma vez que nem todas as ratas apresentavam rolha, esfregaços foram colhidos até o 5º DPG, para acompanhamento e certificação do estado pseudogravídico. A primeira observação de esfregaço característico e/ou rolha vaginal, determinou o momento do 1º DPG (Dia de Pseudogestação).

Da mesma forma adotada para os animais do Grupo A, somente as ratas que apresentaram as características histológicas apropriadas foram submetidas à cirurgia de indução da decidualização, no 5º DPG.

4.2.4. Indução da Decidualização

Uma vez confirmadas que as ratas do Grupo A e do Grupo B estavam pseudográvidas, realizou-se procedimento cirúrgico para a injeção do agente indutor da decidualização, os quais foram: óleos de oliva, araquis e amêndoas; PBS pH 7,4. Alguns animais não foram induzidos para serem utilizados como controles-negativos.

O procedimento cirúrgico ocorreu sempre em torno das 15 horas do 5º DPG, para o qual utilizamos como anestesia de rotina, inalação com éter etílico PA (Merck).

Em seguida, realizava-se assepsia com etanol a 70% e posterior tricotomia com lâmina de barbear na região dorsal do tronco do animal, logo abaixo da caixa torácica. Nesta área incisou-se corte horizontal de 1,5cm na pele, com tesoura cirúrgica. Tracionando levemente a pele para um dos lados, realizou-se outra incisão pequena (de 0,8cm a 1,0cm) nas camadas musculares inferiores. Em seguida, com total e absoluto cuidado, exteriorizou-se o ovário e a porção inicial do corno uterino, via tecido adiposo unilocular envolvente (tomando-se o cuidado de não induzir lesão neste tecido). Com uma pinça curva, cuidadosamente afastou-se a gordura até se expor a porção inicial do corno uterino e o ovário (junção útero-tubal). Apoiando com uma pinça curva, sob o corno uterino, dava-se sustentabilidade para que a injeção do agente pudesse realizada. Para a injeção utilizou-se seringa descartável de insulina contendo 70 μ L do agente indutor, injetando-o no corno uterino a partir da porção útero-tubal.

Terminada a etapa, suturou-se a camada de tecido muscular neste lado e iniciou-se o mesmo procedimento para o corno oposto. Ao se finalizar a cirurgia, utilizou-se PVPI para assepsia, suturou-se a pele e fez-se nova assepsia com pequena quantidade de álcool 70%, visando remover quaisquer resquícios de sangue e secreções tissulares. Logo em seguida, utilizou-se novamente o PVPI.

Todos os animais submetidos a procedimentos cirúrgicos eram mantidos em condições adequadas (sob aquecimento e observação) para recuperação do processo de anestesia.

4.3. COLETA DO MATERIAL

Para ambos os grupos (A e B) a coleta do útero deciduado foi realizada às 15 horas do 8º DPG (dia de máximo desenvolvimento da reação deciduado). O sacrifício dos animais foi realizado anestesia profunda com éter etílico.

Para a coleta do útero, abriu-se o abdômen, afastou-se as vísceras, e para melhor preservação do material, adicionou-se, antes da retirada do material,

pequena quantidade do fixador (Metacan), para uma melhor preservação dos tecidos.

Após, com uma tesoura cirúrgica pequena e o apoio de uma pinça, os cornos uterinos eram coletados na sua totalidade, incluindo os ovários. Numa placa de parafina, o material era imerso com Metacan e manuseado para a retirada do excesso de gordura mesometrial. Em seguida, os cornos uterinos (com seus respectivos ovários) eram pesados em balança analítica, sendo os valores anotados.

Na seqüência, cada corno foi separado dos ovários. Os cornos uterinos foram fatiados no sentido transversal. Seguindo a orientação recebida da Prof.^a Da' Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade (Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina), alguns cornos eram fatiados em sentido transversal procurando manter em cada secção, pelo menos um sítio de decidualização.

Todos os fragmentos de tecidos obtidos seguiram processamento histotécnico com fixação em Metacan (60% Álcool Etílico P.A., 30% Clorofórmio P.A., 10% Ácido Acético Glacial), seguido de procedimento de rotina para emblocagem em Histosec (Sigma, Co.).

Na microtomia, cortes de 4µm de espessura, foram distendidos em lâminas previamente tratadas com Poly-L-lisina. Tais cortes foram armazenados para posteriores colorações por outros usuários do Laboratório.

5. RESULTADOS E DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

5.1. DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

Como mencionado no capítulo anterior, as ratas foram submetidas a esfregaço vaginal matinal (sempre às 08:00 da manhã, ininterruptamente, incluindo sábados e domingos) de rotina. Contudo, ao longo dos procedimentos de coleta, como há fases (proestro e metaestro) que possuem curta duração (cerca de 12 horas), os esfregaços também foram realizados às 15:00 h, também ininterruptamente, incluindo sábados e domingos. Constatou-se que, nas condições já descritas, a duração é similar à referida na literatura, ou seja:

1. Proestro: cerca de 12 horas;
2. Estro: cerca de 24 horas;
3. Metaestro: cerca de 12 horas (diferentemente do que em camundongas, nas quais este ciclo é mais longo);
4. Diestro: cerca de 60 horas.

Os resultados obtidos nos esfregaços, foram os seguintes:

5.1.1. Fase de Proestro

A figura 01 mostra que neste período, constatou-se sinais de cornificação das células do esfregaço. Como a camada de células cornificadas é ainda pouco desenvolvida, era fácil distinguir células ainda nucleadas, correspondendo às camadas mais inferiores do epitélio vaginal. A ocorrência de PMNs era muito restrita ou inexistente.

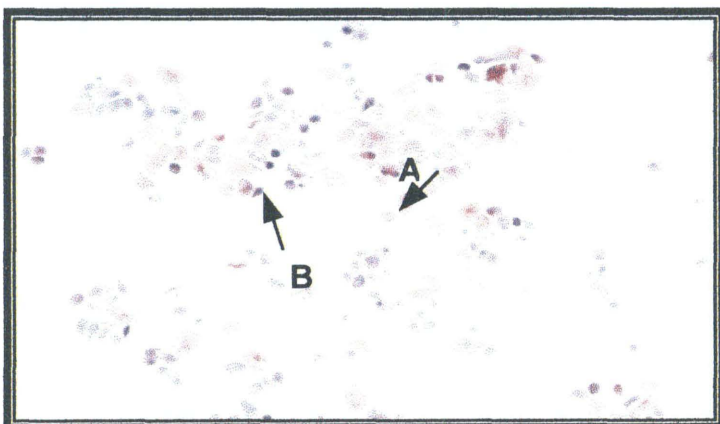


Figura 01 - Fase de Proestro (aumento de 100X) - Shorr:
A) Células anucleadas em menor quantidade;
B) Células nucleadas, com o seu citoplasma basófilo. (azulado).

5.1.2. Fase de Estro

Neste período, é evidente o predomínio de células anucleadas e com acentuada acidofilia, um indicativo de acúmulo de moléculas acidófilas no citoplasma das células epiteliais, provavelmente de citoqueratinas ácidas. A ocorrência de células nucleadas era raríssima ou inexistente, mesmo quando se repetia o esfregaço. (Figura 02)

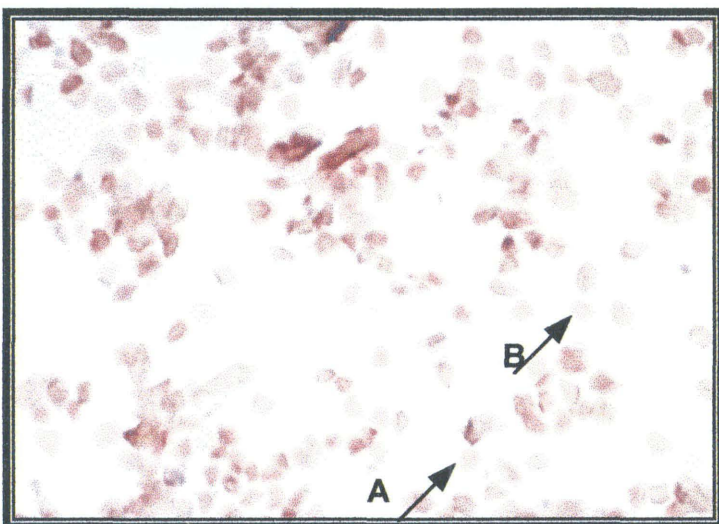


Figura 02 - Fase de Estro (aumento 100X) - Shorr
A) Célula cornificada anucleada e dobrada, em forma de folha amassada;
B) Célula cornificada isolada.

5.1.3. Fase de Metaestro

O esfregaço vaginal apresentou-se ainda algumas células epiteliais anucleadas, geralmente agrupadas e que se coram pelo Shorr. Também estavam presentes células nucleadas, com citoplasma azulado. Denotou-se também a presença de secreção leitosa e viscosa. Vale realçar, que as características demonstradas nos esfregaços desta fase, são muito semelhantes às características observadas nos esfregaços dos animais pseudográvidos (Figura 03).

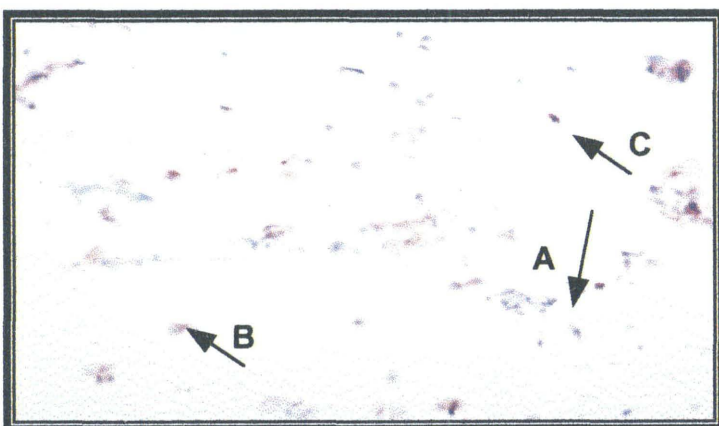


Figura 03 - Fase de Metaestro (aumento 100 X) - Shorr
A) Poucos PMN;
B) Presença de células anucleadas;
C) Células Nucleadas.

5.1.4. Fase de Diestro

A Figura 04 mostra que no esfregaço vaginal há poucas células epiteliais, com citoplasma azulado. Era difícil identificar células em degeneração nuclear como mencionado pela literatura. Contudo, denotou-se importante proliferação de PMNs, além de forte presença de muco.

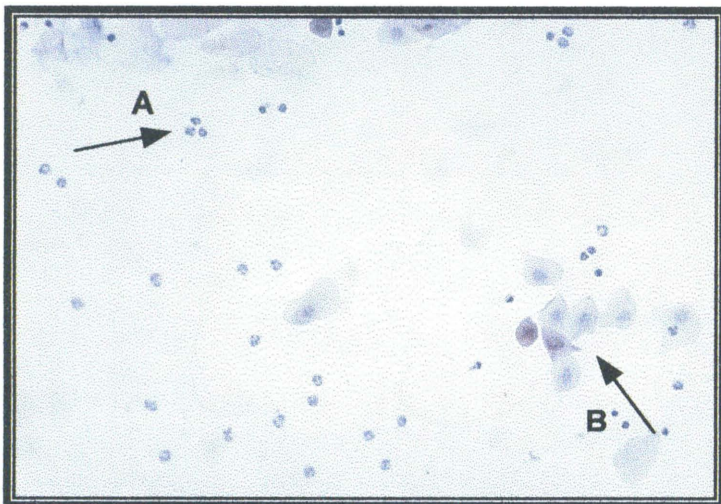


Figura 4 - Fase de Diestro (aumento 100 X) - Shorr
A) Proliferação de PMN;
B) Poucas células nucleadas.

5.2. INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO

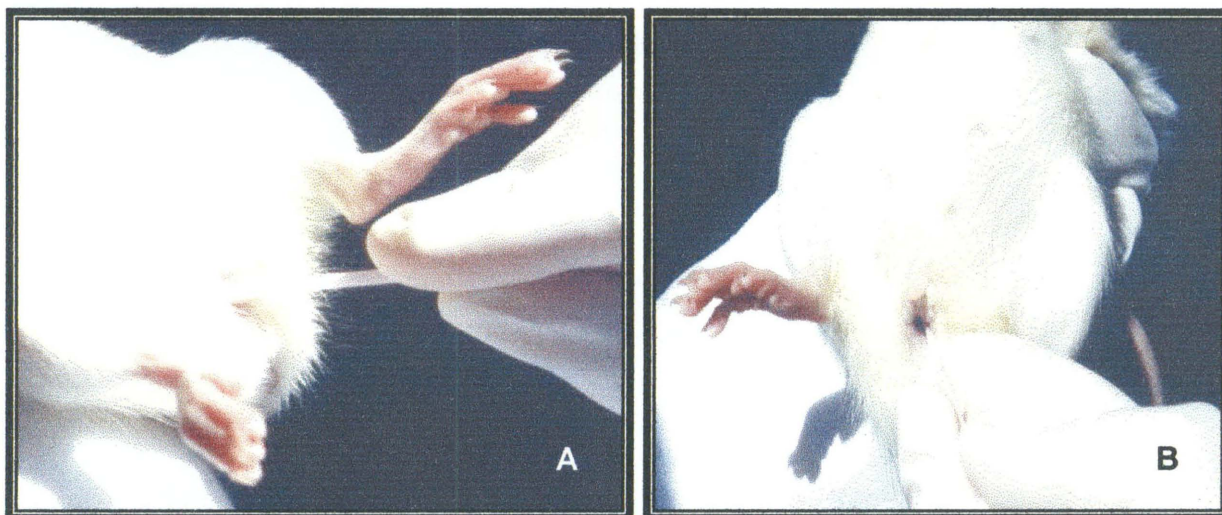


Figura 05 - Indução da Pseudogestação com o cotonete: A) Cuidadosamente, o cotonete previamente umedecido com soro fisiológico era inserido no canal vaginal; B) Em seguida, o cotonete era manuseado na cervix uterina por 20 vezes, através de leves movimentos circulares (aproximadamente 180°).

5.3. VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA PSEUDOGESTAÇÃO

Para nos certificarmos de que houvera um estímulo satisfatório, isto é, que a rata estava pseudográvida, realizamos um acompanhamento dos esfregaços vaginais, tanto das ratas do método cotonete, quanto as ratas acasaladas com machos vasectomizados, através de esfregaço de rotina, sempre às 08:00 horas da manhã, do 1º ao 5º DPGs (Dias de Pseudogestação).

No caso das ratas do grupo A (cotonete) foi considerado como 1º DPG, o dia do estímulo cervical, isto é, uma vez se apresentando na fase estro, foi estimulada pelo método cotonete, às 18:00 horas.

Vale salientar que, em todos os casos em que as ratas foram acasaladas com machos vasectomizados, não foi verificada a presença de rolha vaginal.

Muitas ratas não apresentavam reação inflamatória (presença de PMN) nos primeiros dias. Todavia, foram consideradas pseudográvidas, aquelas que no 4º e 5º DPGs demonstravam o estado de anestro, que é caracterizado como uma fase longa de diestro (GUAZZELLI, 1982), ou as que apresentavam reação inflamatória.

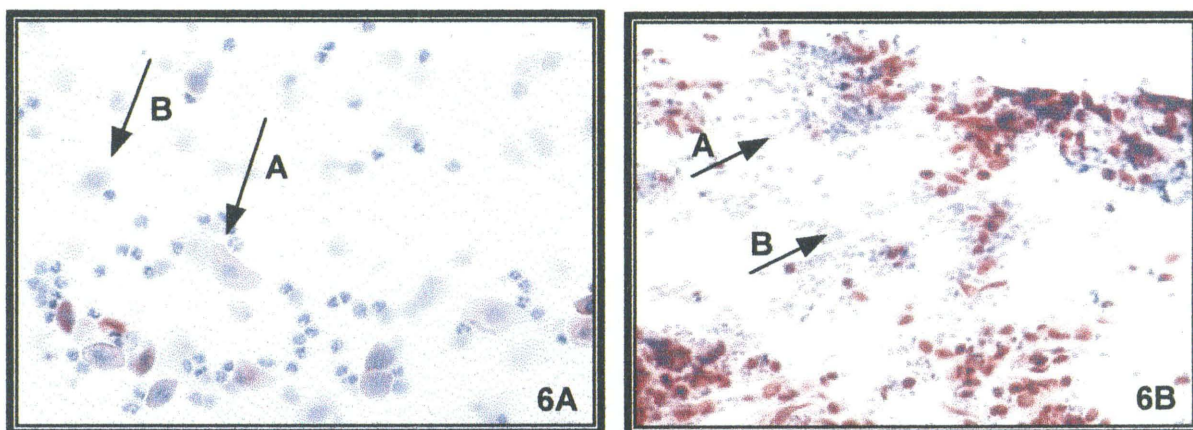


Figura 06 - Estado de Anestro. 6A) Nos esfregaços notava-se a presença de grande quantidade de PMNs (seta A). 6B) Também notou-se a existência de poucas células nucleadas (seta B). (Aumento 100X) – Shorr. Em 6B, verificou-se grande proliferação de PMNs (seta A) e presença de células basais (seta B).

5.4. INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO

Para a indução da decidualização, realizamos metodologia cirúrgica conforme já foi descrito em Materiais e Métodos, com incisão dorsal, expondo-se o ovário e a porção inicial do corno uterino, para a injeção do agente indutor (óleos de oliva, araquis e amêndoas, além da solução tampão PBS pH 7,4).

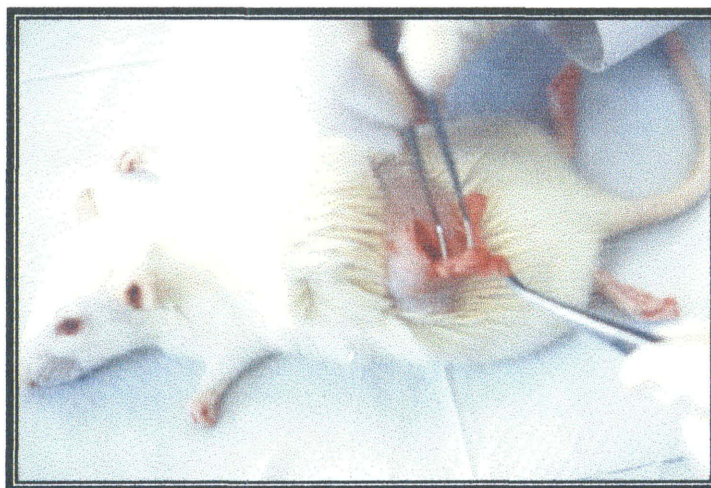


Figura 07 - Procedimento cirúrgico em região dorsal, expondo a região útero-tubal.

5.4.1. Injeção do Agente Indutor

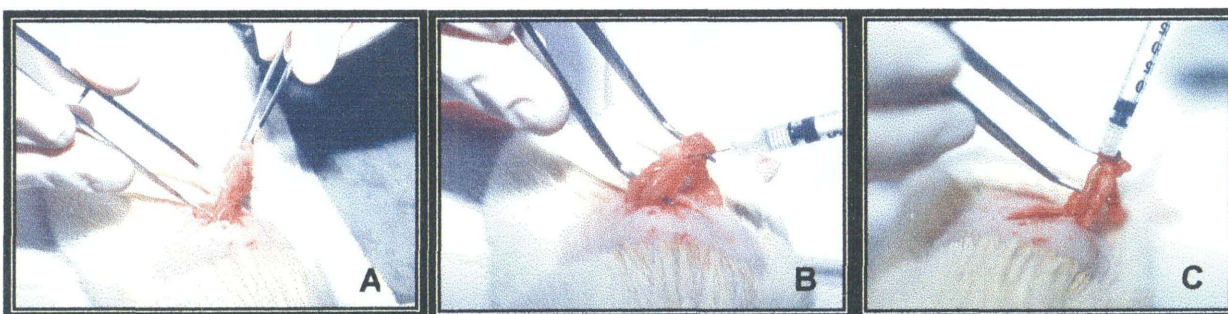


Figura 08 - Injeção do Agente Indutor: A) Inicialmente foi mantido um "suporte" com uma pinça curva, através da porção de gordura, sem lesá-la; B) inserção de seringa de insulina contendo 70 μ L do agente indutor, na porção útero tubal; C) injeção do agente indutor.

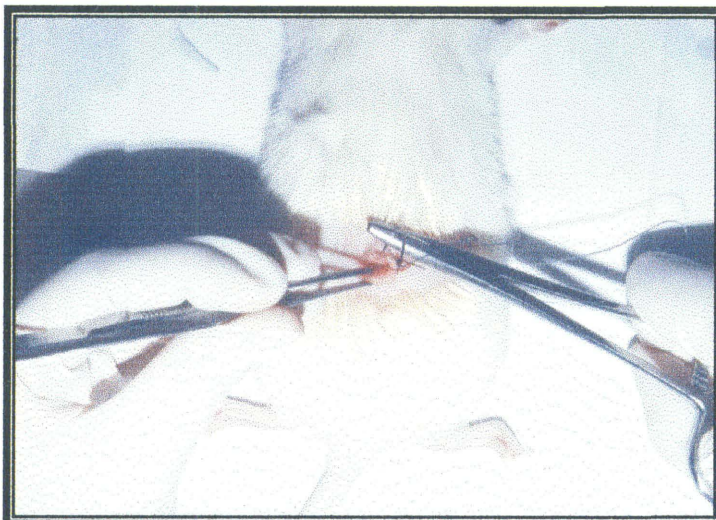


Figura 09 - Após ambos os lados receberem o agente indutor, a rata era suturada e submetida à anti-sepsia com PVPI. Em seguida era acondicionada numa caixa, onde permaneceu até o 8º DPG.

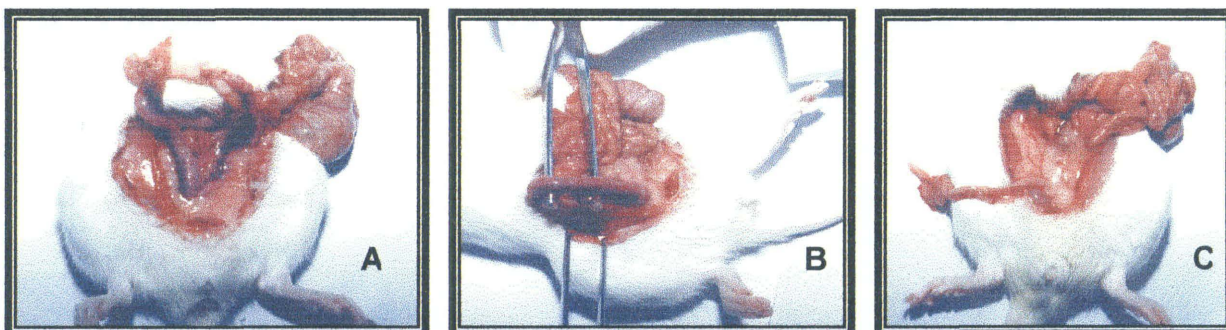


Figura 10 - No 8º DPG, as ratas eram sacrificadas para a coleta e posterior pesagem dos úteros. A) Após abertura abdominal, afastava-se as vísceras para os lados, até chegar no órgão desejado; B) Útero decidualizado; C) Útero não decidualizado (controle).

5.5. COLETA DO MATERIAL

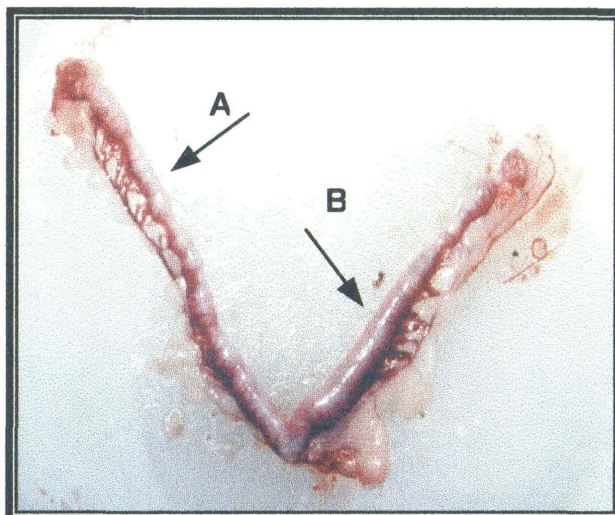


Figura 11 - Útero recém coletado. A) O indutor fragmentou-se em pequenas gotículas e preencheu apenas alguns sítios; B) O indutor preencheu uniformemente todo o fundo da cripta, não diferenciando os sítios.

5.6. PREPARAÇÃO PARA PESAGEM DO MATERIAL

Uma vez coletado o material, retirou-se toda a gordura excedente. Baseando-se em ANDRADE (1993), considerou-se decidualizados os cornos que aparentavam decidualização parcial (alguns sítios) e/ou total.

Visto que o intuito deste trabalho era verificar a combinação de metodologia e indutor que promoveram melhores resultados, foram descartados aqueles animais que, por algum motivo sofreram algum tipo de lesão de ovário ou na gordura circundante, para reduzir ao máximo as variáveis.

5.7. PESOS OBTIDOS

Os pesos referem-se aos pesos totais, isto é, os dois lados dos cornos uterinos, juntamente com seus ovários. Todavia, para evitar a lise celular, antes da pesagem, o órgão foi rapidamente fixado em solução de Metacan (60% Álcool Metílico P.A.; 30% Clorofórmio e 10% de Ácido Acético).

5.7.1. Grupo A : Método do Cotonete

A Tabela 5.6.1, mostra os pesos obtidos dos úteros das ratas submetidas ao método cotonete como indutor da pseudogravidez e seus respectivos agentes indutores da decidualização. As médias referem-se à cada substância indutora. Fica claro que dentre os tipos de óleos utilizados, o óleo de amêndoas é o que melhor induziu a decidualização, com média de 2,090. Segue-se o óleo de araquis (amendoim) e oliva. A indução com PBS foi ineficaz, ao contrário de relatos da literatura.

RATAS	OLIVA	ARAQUIS	AMÊNDOAS	PBS	CONTROLE
01	1,36	1,36	2,32	0,53	0,47
02	1,33	1,57	1,54	0,55	0,44
03	1,38	2,17	2,38	0,51	0,41
04	1,65	2,09	1,90	-	-
05	1,10	1,69	2,31	-	-
MÉDIAS	1,364	1,776	2,090	0,530	0,440

Tabela 5.7.1 – Pesos (útero + ovários) – Método Cotonete

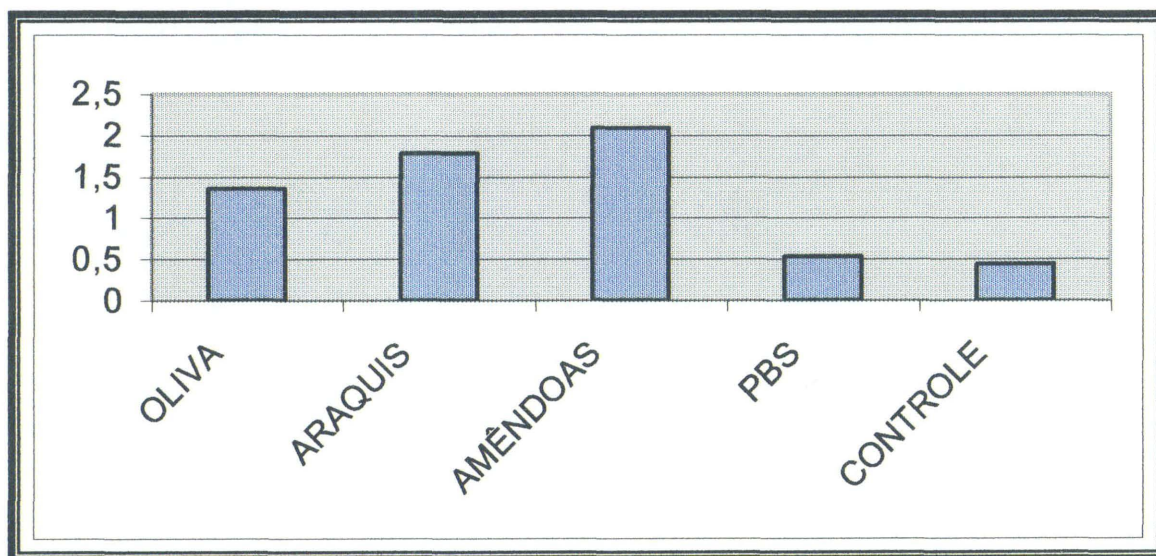


Gráfico 5.7.1 As médias referem-se à cada substância indutora.

5.7.2. Grupo B - Método com Machos Vasectomizados

A Tabela 5.7.2, por sua vez, mostra os pesos obtidos dos úteros das ratas submetidas ao método de acasalamento com machos vasectomizados para disparar a pseudogravidez. Repetiu-se os respectivos agentes indutores da decidualização. As médias referem-se à cada substância indutora. Os resultados mostram muita semelhança com os obtidos pelo método cotonete, ou seja, o óleo de amêndoas é o que melhor induziu a decidualização, com média de 1,840. Segue-se o óleo de araquis (amendoim) e oliva. A indução com PBS também foi ineficaz.

RATAS	OLIVA	ARAQUIS	AMÊNDOAS	PBS	CONTROLE
01	0,91	1,49	1,78	0,77	0,42
02	1,94	1,95	1,95	0,57	0,45
03	0,91	1,75	1,79	1,10	0,47
MÉDIAS	1,253	1,730	1,840	0,813	0,447

Tabela 5.7.2 - Método de Acasalamento com Machos Vasectomizados

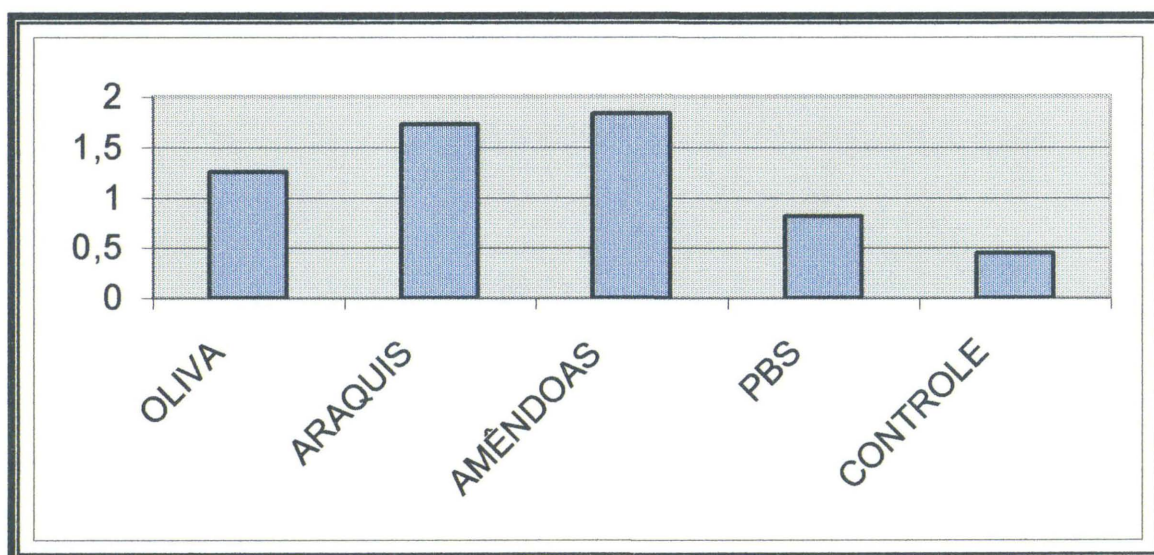


Gráfico 5.7.2. - As médias referem-se à cada substância indutora.

5.8. PREPARAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

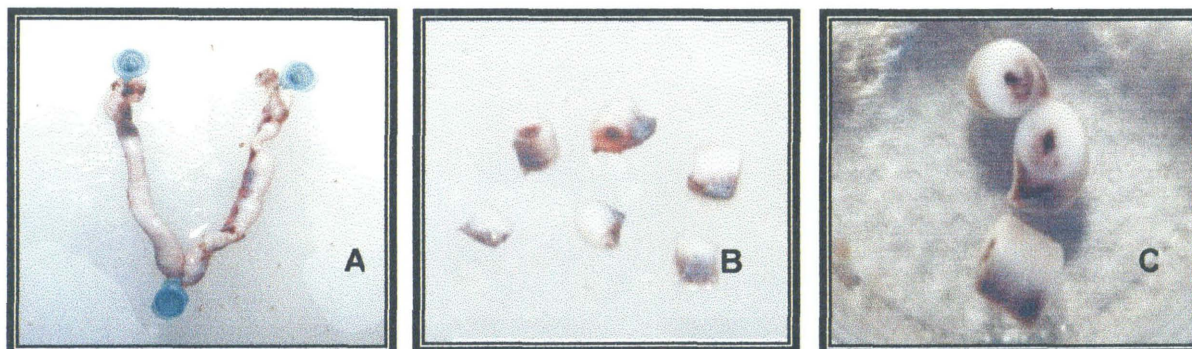


Figura 5.7 - Procedimento para microscopia de luz. A) os cornos foram separados entre si e de seus ovários; B) foram cortados transversalmente ao longo dos sítios de decidualização. Cada secção com cerca de 0,5 a 0,7cm; C) o material foi fixado em Metacac e emblocados.

Após pesados, o material foi fixado em Metacac, porém antes retirou-se os ovários. Os sítios de decidualização foram seccionados transversalmente e processados para microscopia de luz (veja Materiais e Métodos).

6. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia específica e padronização de uma técnica que dependesse o mínimo possível de muitos animais, não apenas pelo custo envolvido na manutenção destes, mas, principalmente por respeito às questões éticas que envolvem experimentos com animais, de acordo com as condições de nosso laboratório e, que pudesse ser desenvolvida facilmente em qualquer outro estudo a ser desenvolvido no futuro.

Inicialmente, os animais de experimentação adotados como modelo experimental no Laboratório, foram os camundongos. Com a utilização destes animais, foram desenvolvidas as técnicas de vasectomia e injeção de óleo, o que resultou num primeiro trabalho produzido, a dissertação intitulada "Localização Imunocitoquímica de Laminina e Fibronectina na Decídua e no Deciduoma de Camundongos Fêmeas", de autoria Muro (2000). Obtivemos excelentes resultados de deciduomas, utilizando machos vasectomizados para induzir a pseudogestação e o óleo de amêndoas, como indutor. Os procedimentos e resultados obtidos foram condizentes com informações sugeridas pela literatura, onde se afirma que em camundongos, os melhores resultados para obtenção de deciduomas, se dá pelo método de acasalamento das fêmeas com machos vasectomizados (De FEO, 1967; ANDRADE, 1993).

Contudo, uma vez modificada a espécie de roedor experimental para ratas, novos horizontes foram abertos, em especial com as dissertações desenvolvidas por Leão (2002) e Bianchini (2002), ambos em fase de redação final. No caso de Bianchini (2002), os resultados aqui apresentados foram e estão sendo extremamente profícuos, uma vez a dificuldade em se determinar o melhor método de obtenção de deciduomas em ratas.

A modificação do modelo animal para ratas, deveu-se por uma série de fatores, dentre os quais as condições do Biotério do Setor. O estudo da escassa literatura pertinente, além de outras variáveis, mostrou que, no caso do modelo em pseudogravidez, era preferível manter a indução da pseudogestação com machos vasectomizados, da mesma forma que era conduzida para camundongas. Além disso, para a indução do deciduoma, que nas camundongas era obtido pelo uso do

óleo de amêndoas, passou-se a utilizar óleo de oliva (segundo informações de De Feo, 1967).

Como pode ser constatado nos resultados (vide tabelas e gráficos 5.7.1. e 5.7.2.), apenas com as análises macroscópicas dos cornos uterinos, e mesmo sem realizar observações histológicas, ficou muito evidente que, em se tratando das condições do nosso Biotério e Laboratório, as recomendações de De Feo não puderam ser seguidas. Podemos afirmar e concluir que o uso de óleo de amêndoas, respeitando-se a condição de que seja purificado e dentro de seu prazo de validade é, como o foi em camundongas, o melhor indutor de decidualização, tanto para camundongas como para ratas. Nossos resultados vão de encontro aos obtidos por ANDRADE (1993) e ANDRADE et al., (1996).

Durante a fase de obtenção de informações, concluímos que a literatura apresenta várias sugestões de como proceder a obtenção de deciduomas. Várias técnicas são descritas (SHELESNYAK, 1952; De Feo, 1967; SANANES et al., 1976), as quais relatam as metodologias que foram bem sucedidas nos ambientes específicos onde foram executadas. Contudo, como foram impossíveis de se tornarem reproduzíveis, e portanto, difíceis de serem aplicados em nosso laboratório, mais uma vez se destaca a importância deste estudo em questão.

Tendo como fundamento não só a metodologia de controle das fases do ciclo estral, mas principalmente o objetivo de controlar a fase de início da pseudogestação a partir da utilização da rotina de esfregaços diários, observamos que alguns animais, quando repetidamente conduzidos para obtenção de tais esfregaços, apresentavam sinais de padrão anestrал característico de que se encontravam em estado pseudogravídico. A partir deste momento surgiu a idéia do uso do cotonete comum, comercial, de baixo custo e encontrado em diversos locais e sem restrição de venda, para promover a indução da pseudogestação.

Em contato pessoal com o Prof. Dr. Paulo Abrahamsohn (Instituto de Ciências Biomédicas da USP), ante a inexistência de indicação literária, fomos instruídos a realizar 20 inserções repetidas na cérvix uterina de ratas em fase de estro, questionando-se apenas se haveria diferença de um pesquisador para outro, uma vez que trata-se de um procedimento delicado e manual. A dúvida foi excluída, quando alguns pesquisadores de nosso laboratório realizaram o mesmo procedimento, obtendo os mesmos resultados, sendo estes satisfatórios.

Testamos o método também com repetições de 10, e até 15 vezes. Todavia não obtivemos resultados satisfatórios (os úteros das ratas não decidualizavam). Quando a estimulação era feita por mais de 20 vezes, além de não obtermos resultados satisfatórios, as ratas passavam a apresentar uma acentuada reação inflamatória.

Resolvemos então, baseando-nos exclusivamente nas experiências pessoais de nosso laboratório, e também com a escassa literatura pertinente, comparar os métodos utilizando macho vasectomizado e cotonete, para verificarmos se haveriam diferenças entre as duas metodologias. Além dos nossos resultados, as informações repassadas pelo Prof. Dr. Paulo Abrahamsohn e, também, com o auxílio da Prof.^a Dr.^a Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade (Departamento de Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas da UEL-PR) com a qual aprendemos a técnica de injeção de óleo de araquis (amendoim) em camundongas pseudográvidas, confirmamos não haver diferenças estruturais no decíduoma das duas técnicas.

Bastava-nos verificar quais as diferenças, primariamente macroscópicas, dos diferentes tipos de óleos já por nós utilizados (o óleo de araquis é extensamente utilizado nos estudos de decíduoma da Prof.^a Dr.^a Célia G. T. de J. Andrade).

Alguns autores sugerem o uso outros agentes indutores da decidualização. Finn & Keen (1963), utilizaram solução salina tampão em seus estudos, obtendo bons resultados em ratas. Entretanto, por razões de difícil explicação, a utilização de PBS tamponado em pH 7,4 utilizada em nosso procedimentos, foi totalmente ineficaz, sendo os resultados comparados àqueles dos animais-controle (sem qualquer estímulo deciduogênico).

Em nossos resultados, foi evidente que a melhor substância indutora foi o óleo de amêndoas, mas o óleo de araquis também forneceu bons resultados. Em tempos em que há uma preocupação claramente colocada em eventos como Simpósios e Congressos, sobre o uso de animais em experimentos científicos, fica evidente que, se podemos utilizar técnicas alternativas e de baixo custo, que dispensam, pelo menos a utilização de animais machos, com resultados bem melhores, é este o modelo que devemos utilizar.

7 CONCLUSÕES

- 1) As análises das fases do ciclo estral, mostram completa correlação com as relatadas pela literatura;
- 2) Dentre os diversos agentes indutores da decidualização artificialmente induzida, os óleos vegetais se mostraram os mais adequados;
- 3) Comparando-se os resultados entre os três tipos de óleos administrados, o óleo de amêndoas foi o que mais se destacou, independente da forma como foi desencadeada a pseudogestação (vide Tabelas e Gráficos 5.7.1 e 5.7.2);
- 4) A indução da pseudogestação com uso de cotonete (Método Cotonete) mostrou a mesma eficiência da indução por acasalamento com machos vasectomizados. Entretanto, por se tratar de um método menos dispendioso, será recomendado a sua utilização em estudos futuros no Laboratório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol.*, 166, 263-74, 1983.
- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.*, 266, 603-28, 1993.
- ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. *Am J. Anat.*, 30:297-371, 1972.
- ANDRADE, C. G. T. J. **Decidualização induzida de camundongas pseudográvidas.** Estudo Morfológico Ultraestrutural. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado em Ciências, Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, C. G. T. J.; ABRAHAMSOHN, P. A.; GODINHO, F.; SAMUEL, E.; ZORN, T. M. T. Death and replacement of uterine epithelial cells during oil-induced deciduoma development in the mouse. *Anat. Rec.* 244, 316-26, 1996.
- BRONSON, F. H., DAGG, C. P., SNELL, G. D.; **Reproduction. Biology of the Laboratory Mouse by the Staff of the Jackson Laboratory.** McGraw-Hill Book Company, New York, 1966.
- CUNNINGHAM, J. C.; **Tratado de Fisiologia Veterinária.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J.; **Histologia Básica.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- De FEO, V. J. Decidualization. In: WYNN, R. M. (Ed). **Cellular Biology of the uterus.** Amsterdam: North Holland, 1967. p.192-291.
- ECKSTEIN, P.; ZUCKERMAN, S. Changes in the accessory reproductive organs of the nonpregnant female. In: **Marshall's Physiology of Reproduction.** Ed Green. London, Longmans, p. 565-72, 1956.
- ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am. J. Anat.*, 12, 185-226, 1967.
- FINN, C. A. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. (Ed) **Biology of the Uterus.** New York: Plenum Press, 1977. p. 245-308.
- FINN, C. A. and KEEN, P. M. The induction of deciduomata in the rat. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 11, 673-682, 1963.
- FINN, C. A.; MARTIN, L. Patterns of cell division in the mouse uterus during early pregnancy. *J. Endocrinol.*, 39, 593-7, 1967.

- FINN, C. A.; PORTER, D.G. *The Uterus*, Pub. Sciences Group, Acton, U.K., 1975.
- KREHBIEL, R. H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol. Zool.*, 10, 212-233, 1937.
- LOBEL, B.L.; TIC, L.; SHELESNYAK, M.C. Studies on the mechanisms of nidation. XVII Hystochemical analysis of decidualization in the rat. *Acta Endocr.*, 50, 469-85, 1965.
- LOBEL, B. L.; LEVY, E.; SHELESNYAK, M.C. Studies on the mechanisms of nidation. XXXIV Dynamics of cellular interaction during progestation and implantation in the rat. *Acta Endocr.*, 56, 7-109, 1967.
- MONICE, F.L. *Involução do Deciduoma Induzido em Camundongos Pseudográvidos: estudo estrutural, ultraestrutura e imunocitoquímico*. São Paulo, 1998. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.
- MURO, M.D. *Localização Imunocitoquímica de Laminina e Fibronectina na Decídua e no Deciduoma de Camundongos Fêmeas*. Curitiba, 2000. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.
- RUGH, R. Normal development of the mouse, In: *The mouse*. Minneapolis, Burgess, p. 44-101, 1968.
- SANANES, N.; BAULIEU, E. E.; LE GOASCOGNE, C. Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 6, 153-158, 1976.
- SHELESNYAK, M. C. Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. *Am. J. Physiol.*, 170, 522-527, 1952.
- SNELL, G. D. The early embryology of the mouse, In: *Biology of the laboratory mouse*. New York, Dover, p. 1-54, 1941.
- SOARES GRECA, C. P. S; Nader, H. B.; Dietrich, C. P.; Abrahamsohn, P. A.; Zorn, T. M. T. Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglicans in the endometrium of mice. *An. Rec.* 259, 2000.
- ZORN, T. M. T.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; ABRAHAMSOHN, P. A. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell Tissue Res.*, 244, 443-8, 1986.