

LUIZ FERNANDO BIANCHINI



**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO DE RATAS
PSEUDOGRÁVIDAS TRATADAS COM TAMOXIFENO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio P. Soares Greca

CURITIBA

2002

LUIZ FERNANDO BIANCHINI

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO DE RATAS PSEUDOGRÁVIDAS TRATADAS COM TAMOXIFENO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio P. Soares Greca

CURITIBA

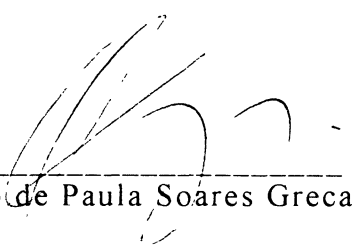
2002

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

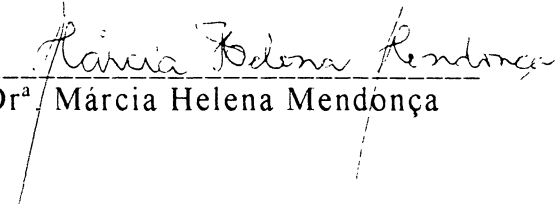
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO DE RATAS PSEUDOGRÁVIDAS TRATADAS COM TAMOXIFENO", de autoria do pós-graduando **Luiz Fernando Bianchini**, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Cláudio de Paula Soares Greca (Orientador e Presidente da UFPR), Dr^a. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade (UEL) e Dr^a Márcia Helena Mendonça – (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Cláudio de Paula Soares Greca, nota 10,0 (*dez*); Dr^a. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade, nota: 10,0 (*dez*) e Dr^a Márcia Helena Mendonça, nota: 10,0 (*dez*). De acordo com as exigências do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, o candidato foi: APROVADO com a nota: 10 (*dez*), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 29 de novembro de 2002.



Dr. Cláudio de Paula Soares Greca



Dr^a Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade



Dr^a Márcia Helena Mendonça

Dedico este trabalho aos meus pais, sem os quais, hoje não teria identidade, amor e fé.

Para meus irmãos, dos quais senti saudades quando distante, mas que hoje desfruto de harmoniosa companhia.

E a Deus, o grande autor da vida, que sem seu sopro divino, nada existiria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, que muitas vezes ouviram “Não posso”, quando me convidavam a boas partidas de futebol, festas, ou para uma simples conversa para cultivar o amor fraterno das boas amizades, muito obrigado e me desculpem pela ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio P.S. Greca, que muitas vezes não se comportou apenas como orientador, mas bom amigo, sempre preocupado com o futuro profissional e pessoal dos que o cercam.

Ao meu amigo Gabriel, companheiro e autor em conjunto desta tese, muitas vezes confundido como meu irmão, o que sempre me foi de bom grado.

Às meninas do laboratório, Michele, Ana Paula, Carolina e Carla, cada uma fazendo pedaços do trabalho, e que em conjunto, hoje chamamos de Tese. A vocês minha eterna gratidão e amizade.

A todas as pessoas do Departamento de Biologia Celular, local de minha primeira e extremamente agradável experiência profissional, o meu muito obrigado. Posso afirmar que ganhei bons amigos além de ótimos colaboradores e tenho a certeza de que este período de minha vida nunca será esquecido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, que forneceu condições para a execução deste trabalho.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas, de responsabilidade de Cândido e Iselen, que lutam dia a dia para permitir que os pesquisadores possam exercer suas atividades, e a todos os funcionários, ao grande Luiz, Dona Teresinha, Márcia, Marizalda,

Ana Lúcia e Júlio César, pessoas que transmitem alegria e transformam aquele ambiente em um agradável local para trabalho e convívio.

A todos os colegas da pós, que suportaram comigo longas jornadas de disciplinas teóricas e práticas, obrigado pelas boas risadas que me proporcionaram.

A todos os funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, os quais agradeço em nome de Telma, Izabella e Ruth, pela extrema simpatia, competência e seriedade na execução de suas funções.

À Andrea por seu carinho, sonhos e compreensão. Obrigado por estar ao meu lado.

À minha família por tudo que de melhor existe.

A todas as pessoas que passaram por minha vida durante este duro percurso, àquelas que conheci intensamente e mesmo àquelas que mal conheci, muito obrigado pelas coisas boas que tenham feito para mim.

Algumas pessoas confundem o mundo,
Outras pessoas o esclarecem.
Algumas pessoas causam problemas,
Outras pessoas os resolvem.
Algumas apenas criticam,
Outras conduzem as mudanças.

Que pessoa pretende ser?

“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a
cabeça para o céu, enquanto que as cheias a baixam para a terra,
sua mãe”.

Leonardo da Vinci

“A mente que se abre para uma nova idéia jamais voltará ao seu
tamanho original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 BIOLOGIA DO DECIDUOMA	1
1.2 O TAMOXIFENO	7
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 ANIMAIS	14
3.2 VASECTOMIA DOS RATOS MACHOS PARA INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO	14
3.3 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL	14
3.4 ACASALAMENTO PARA OBTENÇÃO DE FÊMEAS GRÁVIDAS E PSEUDOGRÁVIDAS	16
3.5 INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO	17
3.6 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	17
3.7 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE DECIDUALIZAÇÃO	20
3.8 OBTENÇÃO E RECONSTITUIÇÃO DA DROGA	20
3.9 ADMINISTRAÇÃO DA DROGA	21
3.10 METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA DE LUZ	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DO DECIDUOMA	23
4.2 TRATAMENTO DAS RATAS PSEUDOGRÁVIDAS COM TAMOXIFENO	41
5. CONCLUSÕES	49
5.1 QUANTO À PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA	49
5.2 QUANTO AOS RESULTADOS OBTIDOS NAS RATAS PSEUDOGRÁVIDAS TRATADAS COM TAMOXIFENO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esfregaço Vaginal; **Proestro**. Coloração Shorr. Aumento 275X. p. 35.
- Figura 2:** Esfregaço Vaginal; **Estro**. Coloração Shorr. Aumento 275X. p. 35.
- Figura 3:** Esfregaço Vaginal; **Metaestro**. Coloração Shorr. Aumento 275X. p. 36.
- Figura 4:** Esfregaço Vaginal; **Diestro**. Coloração Shorr. Aumento 275X. p. 36.
- Figura 5:** Esfregaço Vaginal; **Anestro**. Coloração Shorr. Aumento 550X. p. 37.
- Figura 6:** Esfregaço Vaginal; **Anestro**. Coloração Shorr. Aumento 550X. p. 37.
- Figura 7:** Útero controle padronização – Macho vasectomizado. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 44.
- Figura 8:** Útero controle padronização – Macho vasectomizado. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 44.
- Figura 9:** Útero controle padronização – Método cotonete. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 44.
- Figura 10:** Útero controle padronização – Método cotonete. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 44.
- Figura 11:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 45.
- Figura 12:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 45.
- Figura 13:** Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 45.
- Figura 14:** Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 45.
- Figura 15:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 46.

- Figura 16:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 46.
- Figura 17:** Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 46.
- Figura 18:** Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 46.
- Figura 19:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 47.
- Figura 20:** Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 47.
- Figura 21:** Deciduoma Padronização – Método Cotonete/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 47.
- Figura 22:** Deciduoma Padronização – Método Cotonete/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 47.
- Figura 23:** Deciduoma controle. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 55.
- Figura 24:** Deciduoma controle. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 55.
- Figura 25:** Útero Tratado com 0,03 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 55X. p. 55.
- Figura 26:** Útero Tratado com 0,03 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 55.
- Figura 27:** Útero Tratado com 0,1 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 55X. p.58.
- Figura 28:** Útero Tratado com 0,1 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 138X. p. 58.

RESUMO

O decíduoma caracteriza-se pela proliferação de células decíduais na ausência do blastocisto. Este evento só é possível se o animal estiver hormonalmente sensibilizado e o contato do blastocisto for substituído por uma substância indutora da decidualização. Alterações nos eventos hormonais podem impedir ou alterar esse processo. O Tamoxifeno é uma droga utilizada amplamente no tratamento de câncer de mama estrógeno-dependente, mas que também tem sido utilizado no auxílio do aborto hormonalmente induzido. Os efeitos do tamoxifeno são dependentes da dose e sítio espécie-específico. Pelas dificuldades na obtenção no modelo biológico em questão, o decíduoma, parte deste trabalho foi dedicado na padronização da técnica de obtenção da pseudogestação. Estes resultados apontam o óleo de amêndoas como o melhor veículo indutor, sendo, por outro lado, o óleo de oliva o agente com menor variabilidade de massas. Com bases nestes resultados, os animais foram tratados com tamoxifeno e analisados em microscopia de luz. No endométrio de ratas, pequenas doses de tamoxifeno (0,03 mg/kg) possuem efeitos antiestrogênicos, alterando o desenvolvimento das células decíduais. Na pseudogestação, este efeito antiestrogênico impede a formação das células decíduais por impedir a sensibilização dos fibroblastos endometriais pelo estrógeno, de forma que estas não se tornam receptíveis ao progesterona, conseqüentemente não formando as células decíduais. Doses maiores de Tamoxifeno (0,1 mg/kg) possuem efeito estrogênico, acelerando o transporte do blastocisto na tuba uterina, de forma que este perde a janela de implantação, provocando o aborto. Na ausência do embrião, como na pseudogestação, o efeito estrogênico do Tamoxifeno favorece o processo decidual, de forma a desenvolver o decíduoma.

ABSTRACT

The deciduomata is characterized by proliferation of decidual cells in absence of the blastocist. It only occurs if the animal had to be in a state of a pseudopregnancy and contact of the blastocist were substituted by a inductive substance of decidualization. Changes in the hormonal events may avoid or cause changes in these process. Tamoxifen is a drug use in large scale in treatment of breast cancer dependent of estrogen, but it is too used to colaborate in the hormonal induced abort. The effects of Tamoxifen are dependents of the quantities and the tissue of action. By troubles in obtation of deciduomata, a part of this work was dedicated to the technical padronization of this biological model. This results showed that the almond oil was the best inductor veicle, and, in the other hand, the olive oil was the minor variability of mass agent. Through this results, the animals was treated with tamoxifen and analiseds in light microscopy. In the rats endometrium, shorts quantities of Tamoxifen (0,03 mg/kg) have antiestrogens effects, changing the decidual cells development. In the pseudopregnancy this antiestrogenic effect blocked the decidual cells fomation by avoid endometrial fibroblast sensibilization by estrogen, by the way that this cells don't recognize the progesteron and they don't form decidual cells. High quantities of Tamoxifen (0,1 mg/kg) have a estrogenic effect, increasing the blastocist transport in the uterine tube, losing the implantation window, causing the abort. In the absence of embryo, like in the pseudopregnance, the estrogenic effect of Tamoxifen help the decidual process and the development of deciduomata occurs.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 BIOLOGIA DO DECIDUOMA

A implantação bem sucedida do blastocisto requer a interação deste com um útero sensibilizado por uma seqüência adequada de hormônios. A implantação somente irá ocorrer com sucesso, se houver uma ação recíproca de estímulos entre a mãe e o embrião. Dentre tais estímulos, encontram-se: 1) os hormônios ovarianos (estrógeno e progesterona); 2) do blastocisto (gonadotrofina coriônica); 3) de prostaglandinas, como a PGE2 em ratas (KENNEDY, 1977); 4) de outros ainda sob investigação. Apesar do grande número de investigações acerca desta interação, a compreensão de todos os mecanismos envolvidos com a implantação ainda não está totalmente desvendada (revisão em ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Em roedores e outros mamíferos, cuja placenta apresenta desenvolvimento hemocorial ou endotélio-corial, o contato do trofoblasto com o epitélio uterino é seguido pela invasão do endométrio pelo embrião, com profundas modificações no estroma conjuntivo endometrial (FINN, 1977). O contato entre o embrião e a superfície do epitélio uterino se deve à combinação de dois fatores: 1) intumescência do blastocisto e; 2) fechamento do lúmen uterino. Acredita-se que ambos os fatores são consequência da ação do progesterona (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). O conjunto destas modificações denomina-se decidualização, sendo que a estrutura resultante denomina-se decídua (PARR; PARR, 1989; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

A primeira descrição morfológica da decídua de roedores foi realizada em ratas por KREHBIEL (1937). Após este trabalho, muitos outros estudos foram realizados abordando diversos aspectos morfológicos e ultra-estruturais da decídua de ratas (ENDERS; SCHLAKE, 1967; WELSH; ENDERS, 1985). ABRAHAMSOHN (1983) foi o primeiro autor a descrever a ultra-estrutura morfológica da decídua desenvolvida em camundongos com enfoque principal sobre a decídua antimesometrial.

Nos primeiros dias de gestação em roedores, entre a fertilização e o início da implantação, modificações vasculares e celulares ocorrem no estroma endometrial. Uma intensa proliferação de fibroblastos foi observada em camundongos a partir do 4º dia de gestação (FINN; MCLAREN, 1967). Além deste evento, a implantação em roedores é acompanhada de outras modificações marcantes no endométrio, que consistem principalmente de alterações na morfologia, organização e metabolismo das células do estroma, os fibroblastos endometriais, levando à formação da decídua. Os fibroblastos endometriais são diferentes dos fibroblastos de outras partes do organismo. Quando sensibilizados por hormônios sexuais, os fibroblastos endometriais podem sofrer transformação decidual.

A princípio, os fibroblastos do estroma endometrial são reconhecidos por sua morfologia fusiforme ou estrelada, com longos prolongamentos, núcleo grande e ovóide. As células encontram-se rodeadas por abundante matriz extracelular. Estes fibroblastos endometriais possuem receptores específicos para hormônios esteróides. Quando o útero adquire níveis hormonais precisos, os fibroblastos endometriais (e por conseqüência todo o endométrio) tornam-se aptos a desencadear a reação decidual. Os hormônios esteróides agem em uma seqüência adequada (estrógeno-progesterona-estrógeno) que deve ser respeitada (FINN, 1977; GRECA, 1996). Desta forma, além do estímulo mecânico fornecido pelo blastocisto sobre o epitélio uterino, o fenômeno da decidualização depende de um sincronismo de desenvolvimento entre o endométrio e o embrião, característica fundamental para o sucesso da implantação. Este período sincrônico de desenvolvimento embrionário e uterino é denominado “janela de implantação” (PSYCHOYOS, 1973; revisão em ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). A ausência desta sincronia pode resultar em falha no processo de implantação (DE FEO, 1967; revisão em MURO, 2000).

As regiões uterinas onde os embriões se implantam são chamadas de sítios de implantação. A reação decidual desenvolve-se centrifugamente a partir da cripta uterina que aloja o embrião, estendendo-se de forma gradual até as imediações do miométrio, onde uma pequena região não-decidualizada é mantida durante toda a gestação. As

regiões situadas entre os sítios de implantação, denominadas sítios de interimplantação, não decidualizam e mantêm as características de endométrio não-grávido (ZORN et al., 1990; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Em ratas, as modificações também seguem o padrão gradativo e centrífugo no sentido da região subepitelial para o miométrio. Pelo dia seis da gestação já é possível distinguir duas áreas ou regiões uterinas (PARR; PARR, 1989), as quais diferem entre si quanto ao período de desenvolvimento, localização, aspectos morfofuncionais e destino: 1) a região antimesometrial (situada do lado oposto ao da inserção do mesométrio) e 2) região mesometrial. Em ratas, a região antimesometrial é subdividida em duas zonas: A) zona decidual primária (ZDP), e B) a zona decidual secundária (ZDS). A decídua mesometrial desenvolve-se mais tardiamente, pelo 8º DG ou 9º DG, possuindo crescimento mais lento e diferenciação menos pronunciada, destinando-se à formação da placenta (WELSH; ENDERS, 1985).

A decídua antimesometrial nas ratas, já pode ser identificada no sexto dia da gestação (6ºDG) (FINN; MCLAREN, 1967). Possui crescimento rápido, mas que perdura por pouco tempo, durante e após o qual se degenera (LOBEL et al., 1967; DUPONT et al., 1976; WELSH; ENDERS, 1987), atingindo seu ponto máximo de desenvolvimento no 8º ou 9º DG (BRIDGMAN, 1948; FINN, 1977). Uma característica importante do processo de decidualização é a expressão maciça de filamentos intermediários de desmina (O'SHEA et al., 1983; GLASSER; JULIAN, 1986; GLASSER et al., 1987; KISALUS; KERR, 1988; ZORN et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2000). No endométrio humano a expressão de desmina tem sido utilizada como um indicador de transformação decidual. (GLASSER; JULIAN, 1986)

Segundo PARR e PARR (1989), a ZDP é considerada uma região transitória, consistindo em uma estreita faixa de células volumosas no estroma subepitelial da cripta onde se inseriu o blastocisto. As células, denominadas de células deciduais maduras, se dispõem paralelamente e de modo compacto, por apresentarem extensas interdigitações e regiões juncionais (incluindo junções gap) (ROGERS et al., 1982). Tais células prendem-

se à parede dos vasos sanguíneos maternos formando junções de aderência com as células endoteliais adjacentes (WELSH; ENDERS, 1985). Posteriormente, essas células se degeneram e são substituídas por células trofoblásticas. A matriz extracelular apresenta-se constituída por fibrilas colágenas e por glicosaminoglicanos (PARR; PARR, 1986). Do ponto de vista funcional a ZDP participa da contenção da invasão do trofoblasto no endométrio por formar uma barreira entre o blastocisto e a circulação materna, impedindo que macromoléculas, imunoglobulinas, microorganismos e células imunocompetentes alcancem o embrião antes deste desenvolver sua própria proteção (PARR; PARR, 1986).

Em torno da ZDP, forma-se a zona decidual secundária (ZDS). Suas células são ricas em glicogênio, volumosas, estreladas, freqüentemente binucleadas, eucromáticas e nucléolo proeminente, apresentando organelas típicas de células envolvidas na síntese e secreção de proteínas, junções gap e extensas áreas de projeções lamelares, as quais freqüentemente se interdigitam com células vizinhas. Tais estruturas contribuem para a formação da cápsula decidual, a qual separa a região do estroma decidualizado das células pré-decíduais (WELSH; ENDERS, 1985). Também apresenta outras células, em menor número, como polimorfonucleares (PMN's), mastócitos, linfócitos, eosinófilos, células da série monócito-macrófago e células granulosas, semelhantes àquelas encontradas na decídua mesometrial. Acredita-se que tais células granulosas pertencem a uma linhagem das células natural killer (PARR et al., 1990).

Todas estas informações foram obtidas a partir da gestação normal, onde o blastocisto funciona como estímulo desencadeador da reação decidual. Entretanto, é possível induzir artificialmente, em roedores hormonalmente sensibilizados, a decidualização através de vários estímulos exógenos. A estrutura resultante deste estímulo é muito semelhante à decídua e denomina-se deciduoma (LOEB, 1908; revisado em ANDRADE, 1993; MONICE, 1998).

LOEB et. al.¹ descreveram a reação decidual artificialmente induzida, como sendo a transformação de um estroma endometrial pró-grávido em tecido decidual, isto é, a reação uterina associada com os estágios iniciais da implantação do blastocisto (LOEB, 1908 apud LOBEL, 1965).

O primeiro passo para a obtenção do decíduoma é induzir a fêmea a um estado de pseudogestação (PDG). Neste caso diversos métodos podem ser utilizados. Em ratas, a pseudogestação pode ser induzida por estimulação mecânica ou por choque elétrico aplicados a cérvix uterina. Em camundongos e em hamsters, o método mais seguro para obtenção da pseudogestação é o acasalamento de fêmeas férteis com machos vasectomizados (DE FEO, 1967), mas o mesmo é aplicável em ratos. Uma vez em estado de pseudogestação, a decidualização pode ser induzida artificialmente através de estímulos diversos, tais como estímulo mecânico, ou ainda, a injeção intra-uterina de polissacarídeos, solução salina e óleos vegetais (FINN; KEEN, 1963; FINN, 1977; ANDRADE, 1993, ANDRADE et al., 1996).

LOBEL et al. (1965) sugeriram que a seqüência de eventos para a formação do decíduoma pode ser descrita a partir do estabelecimento do endométrio pseudográvido pela ação do progesterona em um útero sensibilizado pelo estrógeno. Durante a predominância da atividade do progesterona surge uma onda de estrógeno no 3º DPG. Esta onda de estrógeno sensibiliza o endométrio à histamina, ao passo que esta induz o endométrio a decidualização. Além da ação no endométrio, esta onda de estrógeno induz alterações celulares no epitélio uterino que resultam na remoção da barreira apical que impede o contato entre a superfície materna e do blastocisto para que ocorra a implantação (MORRIS et al., 1988).

Nos primeiros três dias de pseudogestação o útero se apresenta similar à fase de diestro, exceto que a lâmina endometrial se apresenta com maior celularidade. No

LOEB, L. The production of deciduomata and the relation between the ovaries and formation of decidua. **JAMA (Journal of the American Medical Association)**, v. 50, p.1897-1901, 1908

entanto, no 4º DPG modificações importantes já podem ser observadas. Dentre tais alterações, podemos mencionar, o aumento da vascularidade e na permeabilidade, o que causa edema e conseqüente afrouxamento do tecido conjuntivo e infiltração de leucócitos eosinofílicos. Ao redor do lúmen do útero há significativo aumento na celularidade acompanhada pelo aumento da basofilia, e as glândulas endometriais se apresentam mais ativas (LOBEL, 1965).

ANDRADE (1993) realizou amplo estudo sobre a morfologia do decíduoma de camundongos do 5º ao 7º DPG, em microscopia eletrônica de transmissão. Este autor observou serem as células decíduais muito semelhantes àquelas descritas na decídua. Algumas diferenças foram apontadas, entre elas um desenvolvimento mais exuberante do decíduoma, evidenciado pela expressão precoce de algumas características morfológicas típicas da decidualização. O autor também sugere que o blastocisto, embora não seja imprescindível no desencadeamento da reação decidual, parece ser importante no controle do desenvolvimento deste processo.

Em estudo posterior, ANDRADE et al. (1996) mostraram que as células epiteliais do revestimento luminal do útero de camundongos, no período compreendido entre os 6º e 7º DPG, apresentavam um comportamento peculiar quando comparado aos mesmos dias de gestação normal. Embora tenha ocorrido perda do epitélio uterino por ocasião do 5º DPG, este epitélio era restaurado nos dias seguintes, sendo observado como uma delgada camada de células achatadas recobrimdo a maior parte da cripta uterina. Os autores sugeriram que este epitélio era renovado a partir da proliferação e migração de células do epitélio luminal da região mesometrial da cripta uterina. Sugerem ainda que componentes da membrana basal devem orientar a migração celular durante a regeneração.

Em ratas, a principal descrição do decíduoma corresponde aos trabalhos de KREHBIEL (1937) e de O'SHEA et. Al. (1983). Nestas descrições tem-se a tentativa de comparar o decíduoma com a decídua normal, com o intuito de esclarecer se o decíduoma é uma proliferação maciça de células como nos tumores, ou se o mesmo corresponde a um crescimento ordenado e preciso como na decídua normal. Considera-se o

desenvolvimento do decíduoma similar ao da reação decidual, no entanto mais exuberante. Desta forma, divide o decíduoma em Zona Decidual Primária (ZDP) e Zona Decidual Secundária (ZDS), cujas descrições já foram vistas anteriormente neste trabalho.

KREHBIEL (1937), no entanto, lista algumas diferenças entre o decíduoma e a decídua normal, tais como (1) a ausência da ampliação da cavidade de implantação, (2) o não desenvolvimento de uma zona de implantação distinta, (3) uma menor área da região central mesometrial.

1.2 O TAMOXIFENO

De acordo com WISEMAN e DUFFY (2001), não apenas hormônios esteróides podem interagir com seus receptores, mas também alguns compostos são capazes de interação com os mesmos.

A introdução de anti-estrogênicos efetivos e não tóxicos que bloqueiam a ação de estrogênios é um fato relativamente recente. No entanto, esses agentes estão sendo utilizados como terapia de primeira linha para o tratamento hormonal de câncer de mama, tanto para tratamento adjuvante e para a terapia de doenças metastáticas. O citrato de tamoxifeno é um composto efetivo utilizado no tratamento de certos tumores que são receptores positivos para estrogênio. Ele também pode ser usado como um adjuvante na prevenção de doença recorrente na pós-menopausa, sendo correntemente estudado como um quimiopreventivo em mulheres com risco de desenvolver câncer de mama. Atualmente tem sido estudado como coadjuvante em abortos induzidos (GILMAN, 1996).

1.1.1 Propriedades Físicas e Químicas

Tamoxifeno corresponde ao [Z]-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)-fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, com peso molecular de 371,53 u.m.a. (THE MERCK INDEX, 1989). Sua fórmula terapêutica apresenta-se como citrato de tamoxifeno, cujo nome químico é

Etanamina,2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi]-N,N-dimetil,(Z)-2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxilato(1:1), peso molecular de 563,65 u.m.a. (unidade de massa atômica) e cuja fórmula empírica é $C_{26}H_{29}NO.C_6H_8O_7$. Apresenta-se como um pó cristalino, fino e de cor branca, com pKa de 8,85 (PHARMACOPEIA, 1989). É muito pouco solúvel em água, solúvel em etanol, metanol e acetona. Encontrado comercialmente pelos nomes Kessar[®], Noltam[®], Nolvadex[®], Tamofen[®], Tamoxasta[®], Tamoxifeno[®], Terimon[®], Zynoplex[®] (THE MERCK INDEX, 1989).

1.2.2 Farmacologia

O Tamoxifeno é um antiestrogênio não esteróide que também possui um pequeno efeito estrogênico (PHARMACOPEIA, 1989). É eficaz em alguns casos de câncer de mama dependente de hormônios, podendo contribuir para a prevenção desses cânceres, sendo também eficaz no câncer endometrial (RANG et al. 1999). O Tamoxifeno age como um inibidor competitivo do ligante de estradiol para o receptor de estrógeno. Quando ligado ao receptor, induz uma mudança na sua conformação tridimensional, inibindo sua ligação ao elemento estrógeno responsivo no DNA (GILMAN, 1996). O Tamoxifeno também pode induzir a ovulação em mulheres que não apresentam ovulação (pré-menarca e em menopausa), estimulando a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina no hipotálamo, que por sua vez, estimula a liberação de gonadotrofinas pela hipófise (PHARMACOPEIA, 1989) o que o torna um possível agente no tratamento da osteoporose.

O Tamoxifeno possui metabolismo hepático, de forma que sua distribuição leva em torno de 7 a 14 horas, e a eliminação pode exceder a sete dias. Normalmente a ação efetiva em tratamento de câncer se dá após 4 a 10 semanas de tratamento. O antagonismo ao estrógeno pode durar várias semanas depois de uma única dose. Sua rota primária de eliminação é fecal sob a forma de metabólitos, mas pode ocorrer eliminação secundária por via renal, em pequenas quantidades (PHARMACOPEIA, 1989).

1.2.3 Ações sobre o útero

O uso do Tamoxifeno no tratamento do câncer de mama em mulheres com idade reprodutiva foi aprovado em 1990, o que aumentou significativamente o risco de exposição fetal à droga. O fato de o Tamoxifeno ser estruturalmente e funcionalmente similar ao dietilbestrol, um estrogênio sintético conhecido por ser teratogênico e possuir efeito carcinogênico no trato reprodutivo, fez com que seu uso neste grupo de mulheres exigisse cautela. Já foram identificadas desordens congênitas, mas o conhecimento sobre a toxicidade do Tamoxifeno no desenvolvimento ainda é incompleto (POULET et al., 1997).

Muitos trabalhos foram realizados para demonstrar a toxicidade do Tamoxifeno no trato reprodutivo e estudos epidemiológicos demonstraram um aumento na incidência de câncer endometrial em mulheres em tratamento prolongado.

IOANNIDIS (1998), relata que o Tamoxifeno, por ser uma droga catiônica anfifílica, interfere no catabolismo lisossomal de lipídios polares mostrando que a droga causa lipidose no epitélio glandular e no miométrio de ratas tratadas com doses orais de 100 mg/kg durante um período de 6-14 semanas.

Atualmente, os estudos sobre o Tamoxifeno estão voltados ao seu possível uso como auxiliar em abortos induzidos, graças à suas propriedades antiestrogênicas (MISHELL et al., 1998).

O Tamoxifeno possui uma disparidade de efeitos biológicos no mesmo sítio de ação e espécies-específicas. Segundo FURR et al.², o Tamoxifeno é um antagonista estrogênico em oviduto de galinha, mas é agonista estrogênico em útero de camundongo. OLIVE et al.³, demonstraram que a droga tem um efeito local no endométrio de primatas por alterar o desenvolvimento e inibir o sucesso da implantação. Estudos de BARKAI et

² FURR, B.J.A.; JORDAN, V.C. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 25, p.127-205, 1984.

³ OLIVE, D.L.; SCHULZ, N.; RIEHL, R.M.; GRODD, T.R.; SCHENKEN, R.S. Effects of tamoxifen on corpus luteum function and luteal phase length in cynomolgus monkeys. **Fertility and Sterility**, New York, v. 54, p. 333-338, 1990.

al. (1992) mostram que o Tamoxifeno inibe a indução da decidualização em ratas pseudográvidas (FURR, 1984; OLIVE, 1990 apud KAPLAN-KRAICER et al., 1996).

Desde que a implantação do blastocisto no útero depende da preparação do endométrio pela ação de estradiol e progesterona, o bloqueio da ação destes dois hormônios deve ser efetivo na prevenção da gravidez (DAO, 1996). Em seus estudos, WIEBE (1999) revê o fato de que níveis normais de estrógeno são requeridos para o sucesso da gravidez e afirma que o Tamoxifeno bloqueia o estrógeno. No entanto, desconhece como exatamente a droga age como abortivo. WIEBE (1999) cita MAJUMDAR⁴ e WISEL⁵, que demonstram decréscimo dos níveis de estradiol endógeno e a interrupção da gravidez em hamster e cobaias pelo uso do Tamoxifeno. Cita também o trabalho de ZHOU⁶ que demonstrou o decréscimo de β -hCG e progesterona em cultura de placenta humana com Tamoxifeno.

Um estudo americano envolvendo 100 mulheres demonstrou que a utilização de 20 mg de Tamoxifeno duas vezes ao dia por quatro dias, acompanhados de 800 mg de misoprostol por via intravaginal nos quatro dias subseqüentes, causou o aborto em 94 mulheres (WIEBE, 1999). Não há relatos de estudos sobre alterações morfológicas e ultra-estruturais do útero grávido ou pseudográvido devido ao uso de Tamoxifeno.

Em ratas, o Tamoxifeno apresenta ação efetiva na prevenção da implantação em ratas, quando administrado por gavagem entre os dias dois e 4 de gestação, ou em dose única antes do quinto dia de gestação. Além de apresentar ação estrogênica em altas doses, o TMX possui propriedades antiestrogênicas em baixas doses (HARPER; WALPOLE, 1967).

MAJOR et al. (1976) demonstrou em seus estudos que o Tamoxifeno pode inibir a implantação completamente, quando administrado nas ratas de sua colônia nas doses de

⁴ MAJUMDAR, N.; DATA, J.K. Contraceptive efficacy of tamoxifen in female hamsters. **Contraception**, New York, v. 41, p.93-103, 1990.

⁵ WISEL, M.S.; DATA, J.K.; SAXENA, R.N. Effects of anti-estrogen on early pregnancy in guinea pigs. **Intl. J. Fertil. Menopausal Stud.** v. 39, p. 156-163, 1994.

⁶ ZHOU, M.H.; HAM, G.Z.; CHU, Y.H. Effects of antiestrogenic drug tamoxifen on human placental excretion of progesterone and human chorionic gonadotrophin during early gestation. **Acta Pharmaceutica Sinica**, Beijing, v.

0,2 mg/kg em dose única no segundo dia de gestação. Sugere que este efeito ocorre porque o Tamoxifeno reduz ou elimina a onda de estrógeno nidatória, por inibir sua síntese pelos ovários.

Estudos recentes tem demonstrado que a ação do Tamoxifeno está relacionada ao receptor de estrógeno, e não somente na inibição de sua síntese (MOURITS et al., 2001). O receptor ligante de estrógeno age como um potente fator de transcrição que controla a expressão de alguns genes, incluindo os genes que codificam a expressão do receptor de progesterona e proteínas reguladoras do crescimento (GREEN et al.⁷, PARKER et al.⁸ apud MOURITS et al., 2001). Algumas destas proteínas regulatórias, quando secretadas por uma célula tumoral, estimula o crescimento de novas células por ligarem-se a seus receptores. Outros fatores também estimulam o crescimento de tecido estromal, como fibroblastos e vasos sanguíneos.

O receptor de estrógeno apresenta-se como uma estrutura complexa e que não se liga apenas ao estrógeno, mas também a outras substâncias como o Tamoxifeno, o clomifene, raloxifene e toremifene. Os efeitos celulares específicos do Tamoxifeno nos tecidos genitais e seus efeitos divergentes em mulheres em pré e pós-menopausa são complexos, tornando difícil a determinação de seu efeito biológico, ou seja, se o Tamoxifeno age como agonista ou antagonista estrogênico no trato genital específico (MOURITS et al., 2001). O'BRIAN et al.⁹ e LAM¹⁰ demonstraram que o Tamoxifeno também interage com outras proteínas celulares além do receptor de estrógeno, tais como a proteína quinase C, calmodulina e proteínas associadas a membranas (O'BRIAN et al., 1985; LAM, 1984 apud MOURITS et al., 2001).

26, p. 801-804, 1991.

⁷ GREEN, S; CHAMBON, P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. **Trends in Genetics**, Limerick, v. 4, p. 309-314, 1988.

⁸ PARKER, M.G.; FAWELL, S.E.; LEES, J.A.; WHITE, R.; EMMANS, C.E.; DANIELIAN, P. Function of estrogen receptor as a transcription factor: A target for antiestrogens. In: BRUGGE J, CURRAN E, MCCORMICK F. **Origins of human cancer: A comprehensive review**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 667-674.

⁹ O'BRIAN, C.A.; LISKAMP, R.M.; SOLOMON, D.H.; WEINSTEIN, I.B. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. **Cancer Research**, Philadelphia, v.45. p. 2462-2465, 1985.

¹⁰ LAM, H-Y.P. Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 118, p. 27-32, 1984.

1.2.4 Outros efeitos do Tamoxifeno

PAGANO e BIASI (2001) relatam que muitos estudos demonstram efeitos genotóxicos e carcinogênicos causados pelo uso do Tamoxifeno, estando estes efeitos relacionados com a superprodução de radicais de oxigênio, os quais ocorrem durante a ativação do metabólico do tamoxifeno. Em seus trabalhos com embrião de peixe, demonstraram que o tamoxifeno em concentrações terapêuticas pode ser ativado pelos embriões, resultando na liberação de radicais livres de oxigênio, os quais podem oxidar o DNA formando o 8-OHdG (um indicador de dano oxidativo de DNA) acima dos valores de controle. A exposição ao tamoxifeno resulta em anormalidades citogenéticas e de desenvolvimento.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Sabemos que no modelo biológico em questão, o decíduoma, estímulos hormonais são imprescindíveis para que ocorra a reação decidual. Se for utilizado de alguma droga que iniba algum hormônio envolvido neste processo, espera-se obter a inibição da decidualização. Tais estudos já se demonstram presentes com a utilização da droga Tamoxifeno (BARKAI et al., 1992) estando estes relacionados ao uso do Tamoxifeno na clínica, tanto como anti-neoplásico quanto à eficácia do mesmo como coadjuvante em abortos induzidos. Ao nosso conhecimento, são raros os estudos que descrevam a estrutura morfológica do processo decidual com o uso do Tamoxifeno.

Por apresentar ação antagonista e agonista de estrogênio conforme o sítio de ação e espécie em estudo, o Tamoxifeno impede a implantação do blastocisto em ratas grávidas por acelerar o transporte do blastocisto na tuba uterina, demonstrando efeito agonista (KAPLAN-KRAICER et al., 1996). No entanto, como em ratas pseudográvidas não existe a presença do blastocisto, não se esperaria a inibição da decidualização. Contudo estudos de BARKAI et al. (1992) mostram atividade antagonista do Tamoxifeno impedindo a formação da reação decidual. Sendo assim, o Tamoxifeno é uma substância que produz alterações suficientes no trato reprodutivo, tanto a nível fetal quanto materno, que podem afetar não somente o sucesso da implantação como também o desenvolvimento da reação decidual.

Sendo a decídua um bom modelo de estudo em biologia celular (ABRAHAMSOHN, 1989; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993), a proposta principal deste estudo foi:

- 1) Padronizar a técnica de obtenção do decíduoma em *Rattus norvegicus*, Var. Wistar;
- 2) Investigar, a nível morfológico, as possíveis alterações induzidas pela presença de Tamoxifeno no endométrio de ratas em estado de pseudogestação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas no total, 56 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus* var. Wistar), com cerca de três meses de idade, nulíparas, além de 10 ratos machos vasectomizados. Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde receberam alimento e água *ad libitum*.

Os animais foram acondicionados em caixa (40cm X 25cm X 15cm) e alojadas em sala do Biotério, com sistema de controle de fotoperíodo (12 horas claro, 12 horas escuro) e temperatura média de 23 °C.

3.2 VASECTOMIA DOS RATOS MACHOS PARA INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO

Um grupo de 10 ratos machos foi submetido, após anestesia apropriada, à cirurgia de ligamento total dos ductos deferentes (vasectomia). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas onde receberam água e ração convencional *ad libitum*. Após este período, para certificar-se de que o processo cirúrgico foi eficaz (controle da vasectomia), duas ratas foram colocadas nas gaiolas dos machos vasectomizados para acasalamento. Estas ratas foram mantidas com os ratos vasectomizados por um período de um mês, onde se esperou indícios de gravidez. Após este período, os ratos cuja vasectomia foi eficaz, tornaram-se aptos a integrar o plantel e foram utilizados para os experimentos.

3.3. DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

Antes de iniciar os esfregaços vaginais, cada rata recebeu uma marcação, para diferenciação e controle do experimento. Diariamente, as ratas foram submetidas à

metodologia de rotina utilizada para a determinação do ciclo estral. A coleta dos esfregaços era realizada entre 7 e 8 horas da manhã, com a utilização de cotonetes esterilizados (com o excesso de algodão retirado anteriormente) embebidos numa pequena quantidade de soro fisiológico 0,9%.

O soro fisiológico foi utilizado para equacionar um problema freqüente apresentado pelos animais, que era o surgimento de reações inflamatórias constantes na mucosa vaginal, pelo manuseio diário. Tal procedimento teve como base as observações descritas por HARTMANN (1993). Assim, o cotonete era cuidadosamente inserido na cavidade vaginal da rata, girando-o totalmente apenas uma vez. Ao ser retirado, o material 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, 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 solução de 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 detectar a fase do ciclo em que a rata se encontrava.

Todos os dados pertinentes foram anotados, tais como, presença de leucócitos, células epiteliais nucleadas e anucleadas (geralmente picnóticas) e presença de muco,

quando houvesse. Este controle era feito diariamente, para se certificar de que as 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 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;

(+): até 10 células por campo na lâmina (pouco significativo);

(++): mais de 100 células em toda a lâmina (significativo);

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

3.4 ACASALAMENTO PARA OBTENÇÃO DE FÊMEAS E PSEUDOGRÁVIDAS

Uma vez obtido o plantel de machos vasectomizados, ratas nulíparas foram acondicionadas em gaiolas com machos, na proporção 2:1 durante o período noturno. Esfregaços vaginais eram diariamente realizados a fim de se determinar o primeiro dia de

pseudogestação, observando a presença de polimorfonucleares (DE FEO, 1967), sempre na manhã seguinte ao acasalamento.

3.5 INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO

Na tarde do dia 5 da pseudogestação (entre 15:00h. e 16:00h.), as fêmeas pseudográvidas, sob anestesia apropriada, tiveram seus cornos uterinos expostos através de uma incisura cirúrgica no dorso. Cada corno uterino recebeu na altura da junção útero-tubal, a injeção de 70 μ L de algum dos agentes indutores, como estímulo para a decidualização (FINN; KEEN, 1963). Após este procedimento, os animais foram convenientemente mantidos no laboratório até se recuperarem totalmente da anestesia. Uma vez observada sua total recuperação, as fêmeas eram mantidas no Biotério até a próxima etapa do trabalho.

3.6 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em duas fases de experimentação, sendo a primeira para padronização da técnica de obtenção de decíduoma em ratas, e a segunda, a fase experimental, onde se realizou o tratamento dos animais com o Tamoxifeno.

3.6.1 Grupos para Padronização da Técnica de Obtenção de Decíduoma em Ratas

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

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, eletrochoque ou qualquer outro método que possuem custo maior. Este grupo foi subdividido nos seguintes subgrupos:

Subgrupo A/Oliva: 05 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método cotonete onde se injetou 70 μ L de óleo de oliva no 5° DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo A/Arachis: 05 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método cotonete onde se injetou 70 μ L de óleo de arachis no 5° DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo A/ Amêndoas: 05 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método cotonete onde se injetou 70 μ L de óleo de amêndoas no 5° DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo A/PBS: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método cotonete onde se injetou 70 μ L de PBS no 5° DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo A/Controle: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método cotonete onde nenhuma substância foi injetada como agente desencadeador da reação decidual.

GRUPO B: Para estes animais, a indução da pseudogestação foi realizada através do plantel de ratos machos vasectomizados.

Este método corresponde ao procedimento de rotina do laboratório de Biologia do Endométrio de Roedores, o qual se demonstrou muito eficaz em camundongos. No entanto, até a execução deste trabalho, não havia sido testado no plantel de ratos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas.

Este grupo foi subdividido nos seguintes subgrupos:

Subgrupo Machos Vasectomizados: 10 ratos machos vasectomizados que foram utilizados para a obtenção da pseudogestação.

Subgrupo B/Oliva: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método de acasalamento com macho vasectomizado onde se injetou 70 μ L de óleo de oliva no 5^o DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo B/Arachis: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método de acasalamento com macho vasectomizado onde se injetou 70 μ L de óleo de arachis no 5^o DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo B/Amêndoas: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método de acasalamento com macho vasectomizado onde se injetou 70 μ L de óleo de amêndoas no 5^o DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo B/PBS: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método de acasalamento com macho vasectomizado onde se injetou 70 μ L de PBS no 5^o DPG em cada tuba uterina como agente desencadeador da reação decidual.

Subgrupo B/Controle: 03 ratas sensibilizadas hormonalmente pelo método de acasalamento com macho vasectomizado onde nenhuma substância foi injetada como agente desencadeador da reação decidual.

3.6.2 Animais para Experimentação com Tamoxifeno

Foram utilizados 4 grupos de animais, cada um com 5 ratas e 1 grupo com 10 ratos vasectomizados (*Rattus norvegicus*, var. Wistar). Todas as fêmeas tinham cerca de três meses de idade e peso médio de 200g. Cada grupo era composto por animais nulíparos em estro, pseudográvidos pelo método de acasalamento com machos vasectomizados.

Os grupos experimentais foram determinados da seguinte forma:

Grupo Machos Vasectomizados: 10 ratos machos vasectomizados que foram utilizados para a obtenção da pseudogestação.

Grupo 1 Tratado: 05 ratas pseudográvidas receberam 0,03 mg/kg de TMX nos dias 1, 2 e 3 de pseudogestação e sacrificadas no 8^o DPG.

Grupo 1 Controle: 05 ratas pseudográvidas receberam 0,1mL de veículo nos dias 1, 2 e 3 de pseudogestação e sacrificadas no 8° DPG.

Grupo 2 Tratado: 05 ratas pseudográvidas receberam 0,1 mg/kg de TMX nos dias 1, 2 e 3 de pseudogestação e sacrificadas no 8° DPG.

Grupo 2 Controle: 05 ratas pseudográvidas receberam 0,1mL de veículo nos dias 1, 2 e 3 de pseudogestação e sacrificadas no 8° DPG.

Todas as fêmeas receberam 70 μ L de óleo de oliva em cada tuba uterina como agente indutor da decidualização.

3.7 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE DECIDUALIZAÇÃO

As fêmeas pseudográvidas que receberam a injeção intra-uterina de agente indutor foram sacrificadas no dia 8 da pseudogestação. Os cornos uterinos foram dissecados e processados para metodologia histológica. Os sítios decidualizados das fêmeas pseudográvidas correspondem às regiões do endométrio onde ocorreu decidualização como resposta ao estímulo desencadeado pelo óleo injetado.

Após a dissecação, os cornos uterinos foram removidos, lavados em PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,1M pH 7,4 e imersos na solução fixadora de Metacan para processamento em Microscopia de Luz.

3.8 OBTENÇÃO E RECONSTITUIÇÃO DA DROGA

A droga tamoxifeno foi obtida sob a forma comercial de TAMOXIFENO[®] 10mg, comprimidos, da indústria PHARMACIA & UPJOHN. Cada comprimido contendo 10mg de tamoxifeno foi triturado com pistilo em almofariz, dissolvido em 10 mL de etanol absoluto e diluído em 90 mL de óleo de milho, fornecendo uma solução mãe de 0,1mg/mL de tamoxifeno. A próxima diluição foi calculada conforme o peso do animal.

3.9 ADMINISTRAÇÃO DA DROGA

Devido aos efeitos que o TMX assume dependente da dose, foram administradas as doses de 0,1mg/kg (considerada estrogênica) e 0,03 mg/kg (considerada antiestrogênica). A administração da droga aos grupos experimentais foi realizada utilizando-se agulha de gavagem, sendo portanto, via de administração oral.

3.10 METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA DE LUZ

O primeiro passo para o processamento do material é a fixação, essencial para o processo geral, já que a mesma mantém as propriedades morfológicas e a composição dos tecidos.

Na rotina utilizada no Laboratório de Biologia do Endométrio de Roedores é utilizado como fixador o Metacan, que consiste de uma mistura de metanol, ácido acético e clorofórmio na proporção de 6:3:1.

O deciduoma, depois de fixado, sofreu processamento histológico, o qual seguiu os seguintes passos:

- 1) Fixação em Metacan - 3 horas em temperatura ambiente (T.A.).
- 2) Lavagem em etanol absoluto - 1 minuto (T.A.).
- 3) Banhos em etanol absoluto - 3 x 30 minutos (T.A.).
- 4) Banho etanol absoluto / xileno - overnight (16 horas) (4°C).
- 5) Diafanização em xileno - 3 x 15 minutos (T.A.).
- 6) Impregnação em parafina - 2 ½ horas - 56°C.
- 7) Emblocagem em Histosec (Merck Co.)

Foram realizados cortes em micrótomo de parafina de 4µm de espessura. Os cortes foram distendidos em lâminas revestidas com solução de Poly-L-Lysine (Sigma Co.).

3.10.1 Hematoxilina & Eosina (H.E.)

Esta técnica de coloração histológica é utilizada para a localização das estruturas basófilas e acidófilas do tecido. O corte permanece imerso por 1 minuto na solução de hematoxilina, sendo em seguida mantido em água corrente por 10 minutos para a viragem. Logo após mergulha-se o corte em eosina, por 1 a 5 minutos. Em seguida, realiza-se a desidratação, diafanização e montagem da lamínula com Entellan.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE OBTENÇÃO DO DECIDUOMA

4.1.1 Determinação das Fases do Ciclo Estral

Conforme descrito no item 3.3 do capítulo anterior, as ratas foram submetidas a esfregaço vaginal matinal de rotina (entre 7 e 8 horas da manhã, ininterruptamente, incluindo sábados e domingos). Contudo, ao longo dos procedimentos de coleta, como existem fases (proestro e metaestro) que possuem curta duração (cerca de 12 horas), os esfregaços também foram realizados às 15:00 horas, também ininterruptamente.

Constatou-se que, nas condições já descritas, a duração corrobora à referida na literatura, ou seja:

Proestro: cerca de 12 horas;

Estro: cerca de 24 horas;

Metaestro: cerca de 12 horas (diferentemente do que em camundongas, nas quais este ciclo é mais longo);

Diestro: cerca de 60 horas.

Os resultados obtidos nos esfregaços foram os seguintes:

Fase de Proestro

A Figura 01 mostra que neste período, constatou-se no esfregaço, sinais de cornificação das células epiteliais da mucosa vaginal. Como a camada de células cornificadas é pouco desenvolvida nesta fase, era fácil observar células ainda nucleadas, correspondendo às camadas mais inferiores do epitélio vaginal. A ocorrência de PMN's (polimorfonucleares) era muito restrita, ou mesmo inexistente.

Fase de Estro

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

Fase de Metaestro

O esfregaço vaginal, nesta fase, apresentou algumas células epiteliais anucleadas, geralmente agrupadas e que se coram bem pelo Shorr. Células nucleadas, com citoplasma azulado, correspondente a células intermediárias e basais, faziam parte do esfregaço. 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 pseudogravidos (Figura 03).

Fase de Diestro

A Figura 04 mostra que no esfregaço vaginal ocorrem células epiteliais intermediárias e raras células escamosas. Contudo, denotou-se importante proliferação de PMN's, além de forte presença de muco.

Os animais eram colocados para o acasalamento *overnight* (grupo macho vasectomizado) durante a fase de proestro, enquanto que os animais do grupo cotonete eram estimulados artificialmente na fase de estro.

Figura 1: Esfregaço Vaginal; **Proestro.** Coloração Shorr. Aumento 275X. Observar células cornificadas (seta) e células nucleadas (cabeça de seta).

Figura 2: Esfregaço Vaginal; **Estro.** Coloração Shorr. Aumento 275X. Observar predomínio de células anucleadas (seta).

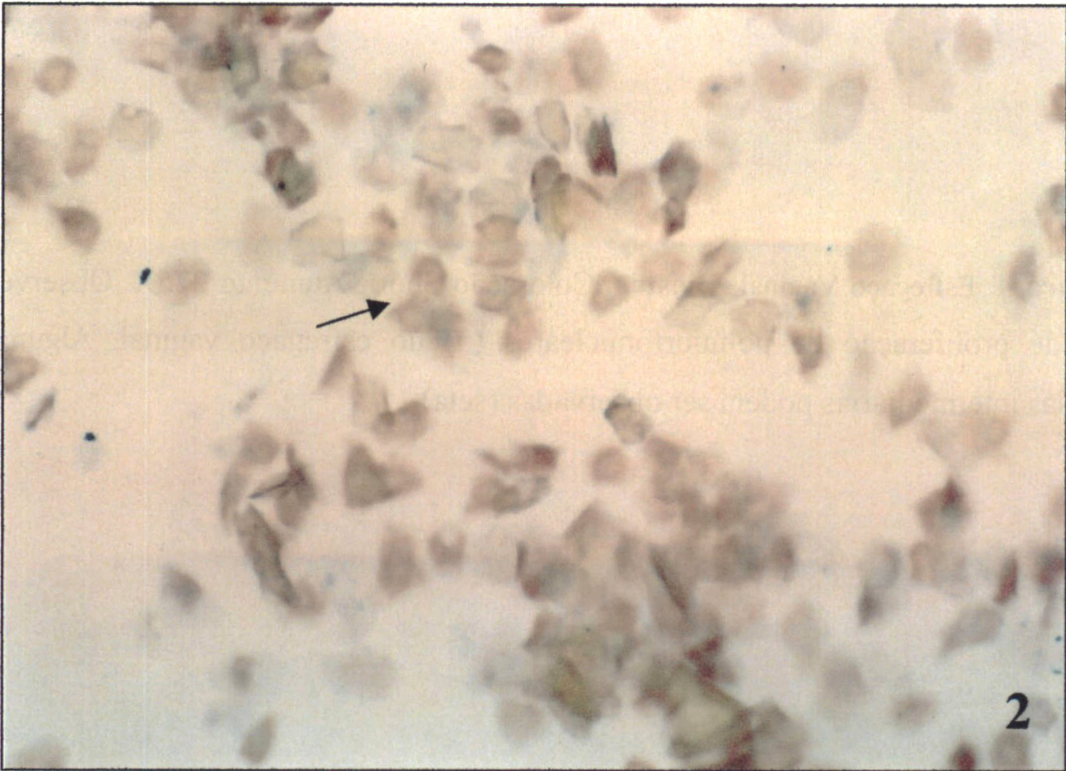
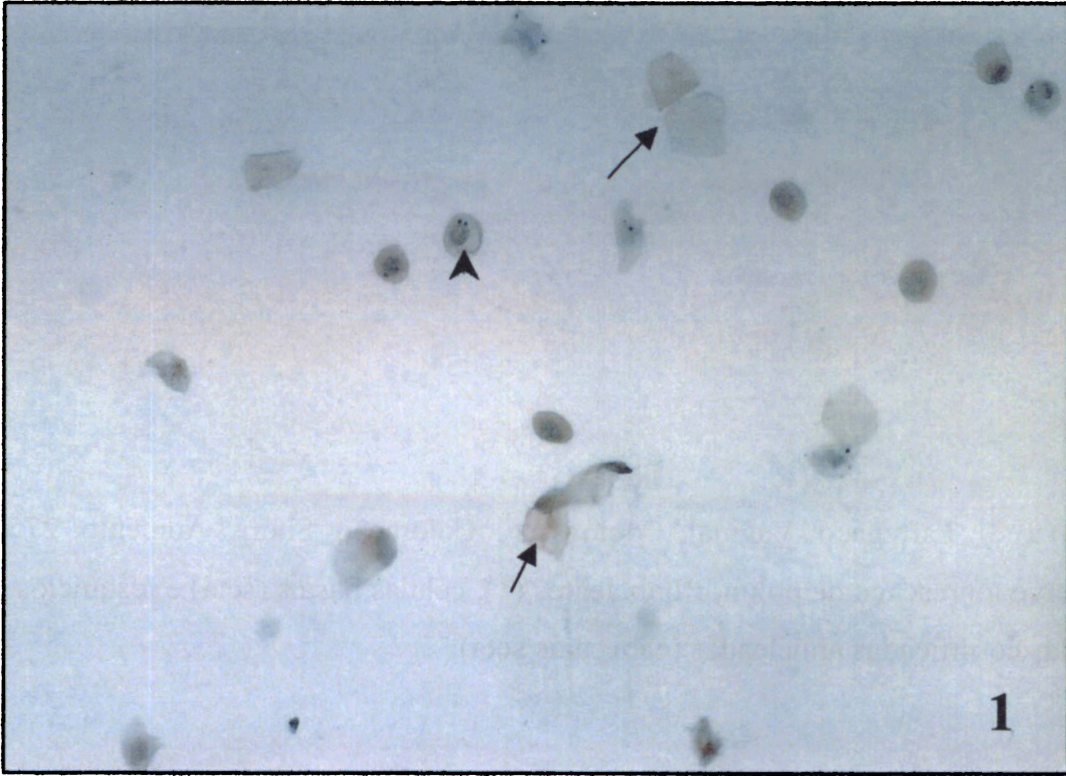


Figura 3: Esfregaço Vaginal; **Metaestro.** Coloração Shorr. Aumento 275X. Observe a presença de polimorfonucleares (*), células basais (seta) e resquícios de células cornificadas anucleadas (cabeça de seta).

Figura 4: Esfregaço Vaginal; **Diestro.** Coloração Shorr. Aumento 275X. Observe a grande proliferação de polimorfonucleares (*) no esfregaço vaginal. Algumas células intermediárias podem ser observadas (seta).

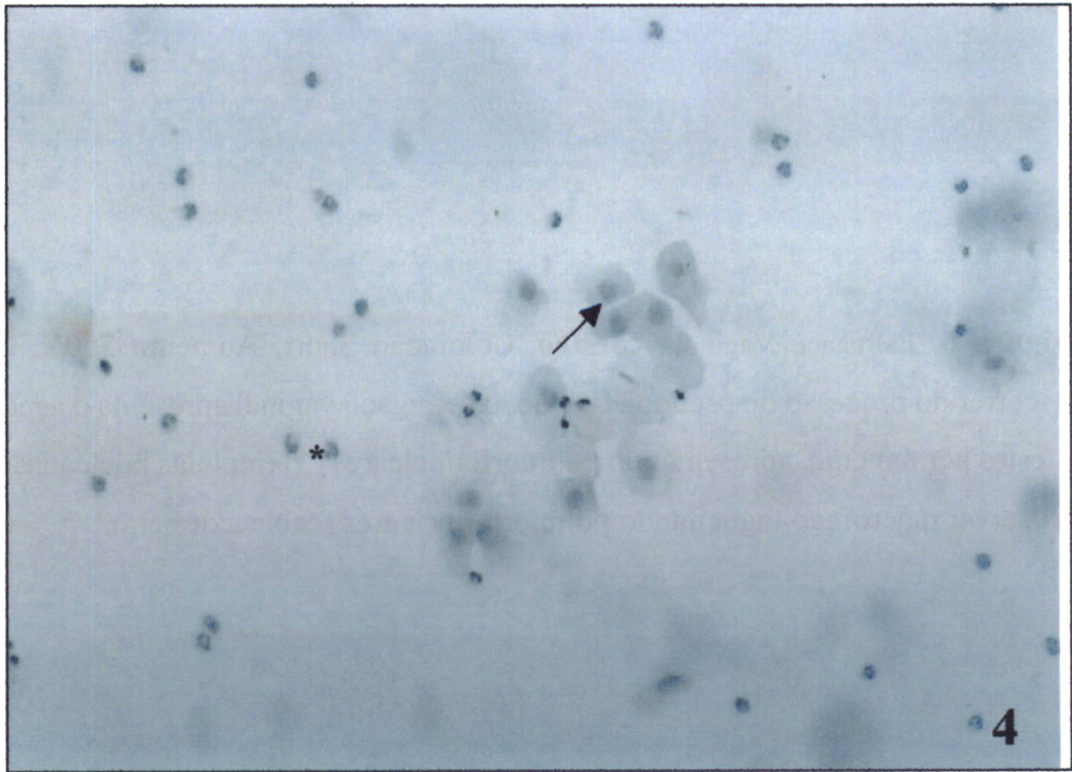
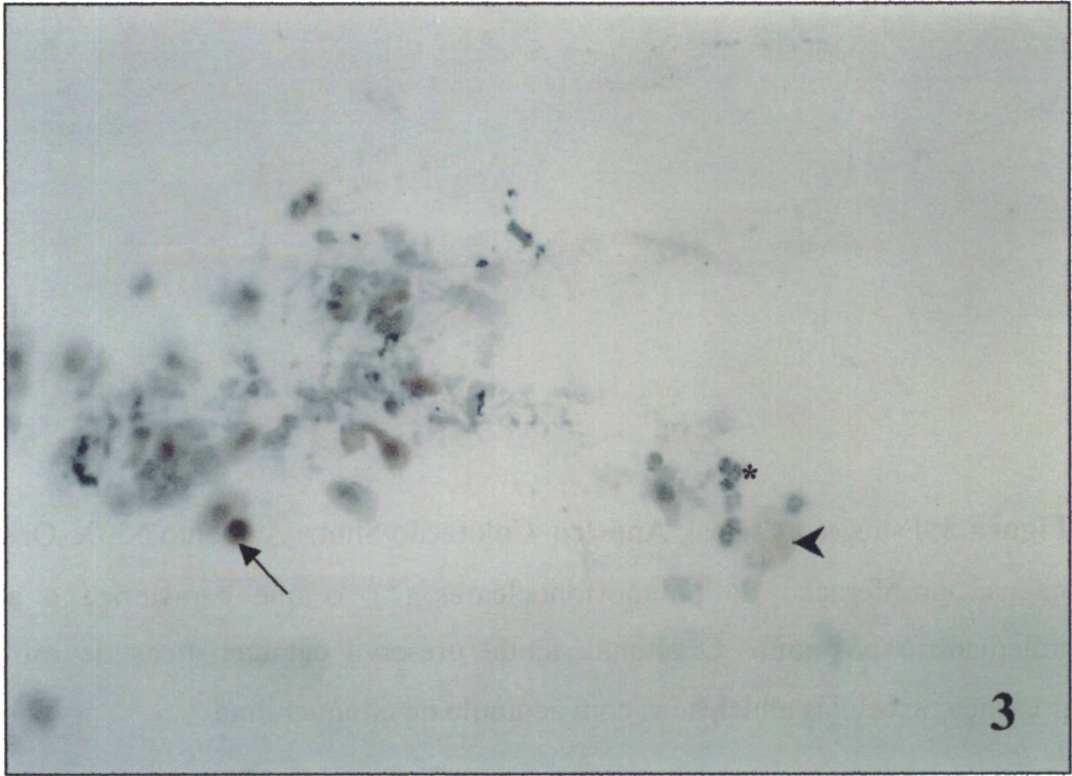
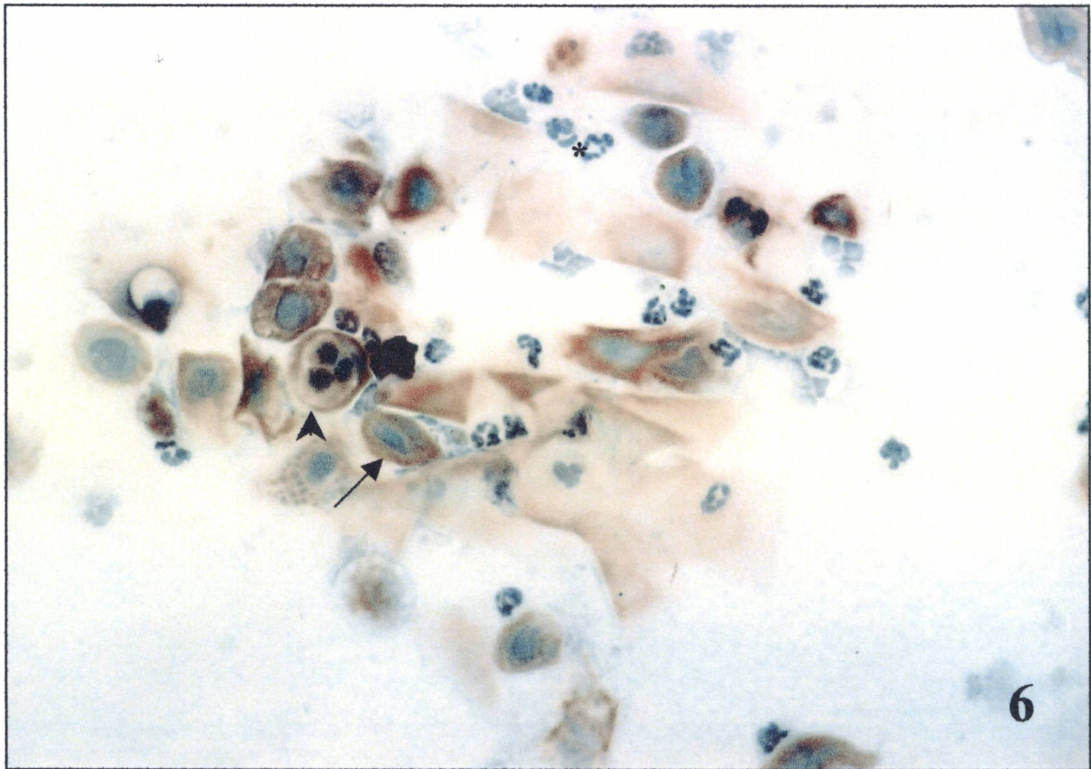
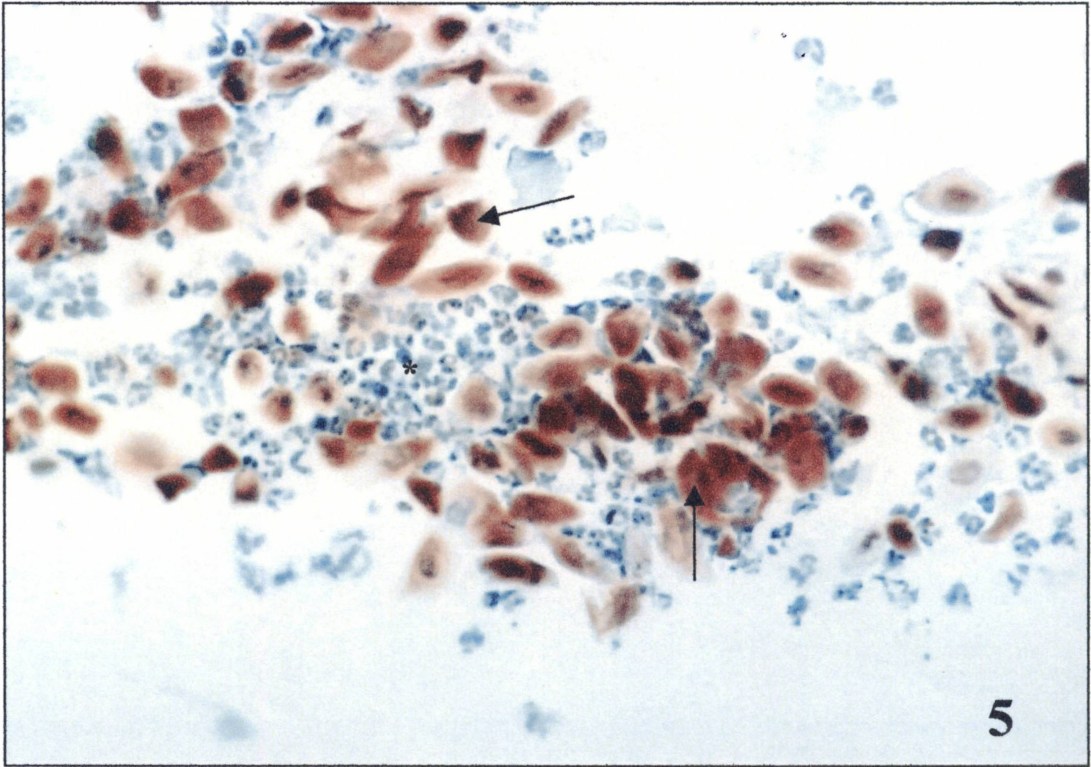


Figura 5: Esfregaço Vaginal; **Anestro.** Coloração Shorr. Aumento 550X. Observe a intensa proliferação de polimorfonucleares (*), o que caracteriza o aspecto inflamatório pós-coito. O animal, ainda preserva características de estro pela presença de células anucleadas com acúmulo de citoqueratina.

Figura 6: Esfregaço Vaginal; **Anestro.** Coloração Shorr. Aumento 550X. Com o decorrer do processo de pseudogestação, o esfregaço vaginal apresenta o aspecto de diestro permanente, apresentando polimorfonucleares (*) e células nucleadas (seta). Observar macrófago fagocitando polimorfonucleares (cabeça de seta).



4.1.2 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 submetidas do método cotonete, quanto das ratas acasaladas com machos vasectomizados, através de esfregaço de rotina, entre as 7 e 8 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, o animal foi estimulado 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 (com presença característica de PMN) nos primeiros dias, no entanto este era o resultado esperado (Figura 5). Todavia, foram consideradas pseudográvidas aquelas que no 4º e no 5º DPGs demonstravam o estado de anestro, o qual é caracterizado como uma fase longa de diestro, ou as que apresentavam reação inflamatória (Figura 6).

4.1.3 Indução da Decidualização

Para a indução da decidualização, realizamos a metodologia cirúrgica descrita 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, arachis e amêndoas, além da solução tampão PBS pH 7,4).

4.1.4. Pesos Obtidos

No 8º DPG os animais do GRUPO A e GRUPO B foram sacrificados, seus úteros foram dissecados e seus pesos correspondentes foram aferidos.

Os pesos referem-se aos pesos totais, isto é, os dois lados dos cornos uterinos, juntamente com seus ovários. Todavia, para evitar 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).

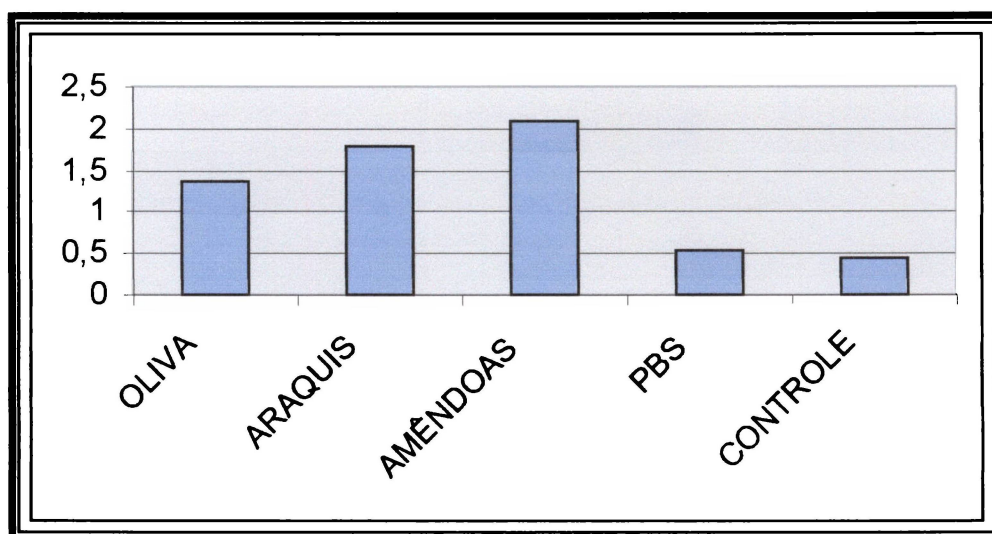
GRUPO A: MÉTODO DO COTONETE

A Tabela 2 mostra os pesos obtidos dos úteros das ratas submetidas ao método cotonete como indutor da pseudogestação e seus respectivos agentes indutores da decidualização. As médias referem-se a cada substância indutora. Fica claro que dentre os tipos de óleos utilizados, o óleo de amêndoas é o que promoveu uma maior reação decidual, com média de 2,090g. Segue-se o óleo de arachis (amendoim) e oliva. A indução com PBS foi ineficaz. A literatura pertinente traz resultados positivos de reação decidual para soluções salinas, o que corresponde ao cloreto de sódio 0,9%. Sendo a constituição de sais do PBS diferente de uma solução salina, por esta razão este resultado não pode ser comparado com os já relatados. O óleo de oliva, por outro lado, foi o agente indutor que apresentou melhor linearidade de resultados.

Tabela 2 – Pesos (útero + ovários) em gramas – Método Cotonete

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

Gráfico 1: Valores médios (em gramas) de massa uterina conforme substância indutora – Método Cotonete.



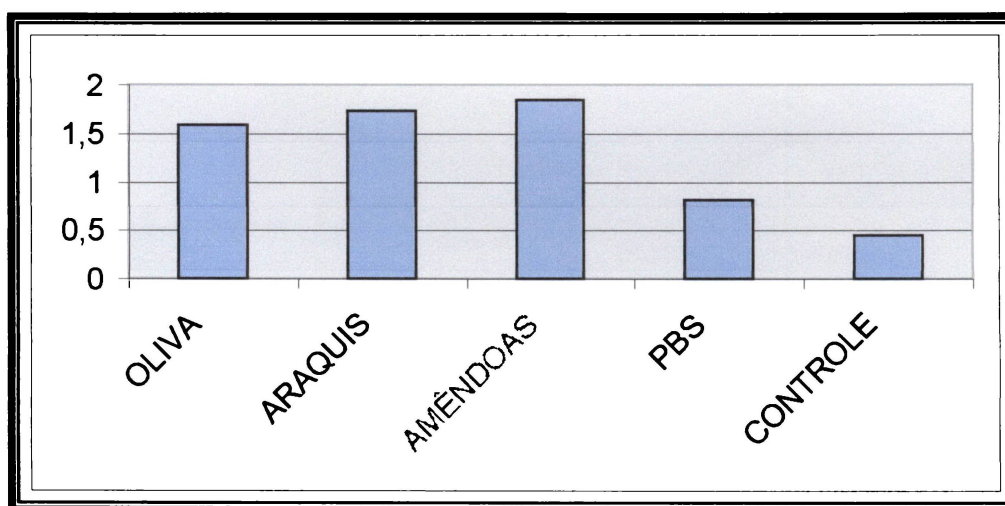
GRUPO “B”: MÉTODO COM MACHOS VASECTOMIZADOS

A Tabela 3 mostra os pesos obtidos dos úteros das ratas submetidas ao método de indução da pseudogestação, com acasalamento com machos vasectomizados. Repetiram-se os respectivos agentes indutores da decidualização. As médias referem-se a 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 1,840g. Segue-se o óleo de arachis (amendoim) e oliva. A indução com PBS também foi ineficaz.

Tabela 3: Pesos (útero + ovários) em gramas – Método Acasalamento Macho Vasectomizado

RATAS	OLIVA	ARAQUIS	AMÊNDOAS	PBS	CONTROLE
01	1,91	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	1,587	1,730	1,840	0,813	0,447

Gráfico 2: Valores médios das massas uterinas (em gramas) conforme substância indutora – Método acasalamento com macho vasectomizado .



4.1.5 Análise Histológica

Os úteros obtidos foram processados para microscopia e corados com hematoxilina e eosina.

Para facilitar as análises, os métodos foram comparados conforme óleo indutor.

Subgrupos Controle:

As Figuras 7 e 8 correspondem ao controle do método macho vasectomizado. Nestes animais, depois do acasalamento, não houve a administração de qualquer agente indutor. Este corte assemelha-se muito ao útero na fase de diestro (LOBEL, 1965), apresentando uma maior celularidade na região abaixo do epitélio uterino na porção antimesometrial. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos nos esfregaços vaginais, onde os animais estão em anestro (Figuras 5 e 6), o que corresponde a um diestro permanente.

Nas Figuras 9 e 10 têm-se os resultados referentes aos animais controle do método cotonete. Constatamos que não há diferenças significativas com o método “macho vasectomizado”, portanto, também temos um corte uterino com aspecto de diestro.

Subgrupos Óleo de Amêndoas:

As Figuras 11 e 12 correspondem aos deciduomas obtidos de animais acasalados com machos vasectomizados, com injeção uterina de óleo de amêndoas, enquanto as Figuras 13 e 14 correspondem aos animais estimulados pelo método cotonete, seguido de injeção uterina também com óleo de amêndoas.

Como descrito na revisão da literatura, a reação decidual se dá de forma centrífuga, a partir da região antimesometrial. A região mesometrial apresentava-se reduzida se comparada com a mesma área em animais grávidos. Podem ser observadas áreas de edema, estando estas mais evidentes nas Figuras 13 e 14.

É possível observar que em ambos os métodos de estimulação foram obtidos resultados satisfatórios, embora a reação decidual tenha sido mais exuberante no animal estimulado pelo método cotonete.

Subgrupo Óleo de Arachis:

As Figuras 15 e 16 correspondem ao subgrupo A/Arachis, enquanto as Figuras 17 e 18 correspondem ao subgrupo B/Arachis. Novamente, é observado, em ambos os grupos, uma boa reação decidual com evidente Zona Decidual Madura. Mais uma vez não existe

diferenças significativas quanto ao processo de formação do decíduoma de acordo com o método de sensibilização hormonal.

Subgrupo Óleo de Oliva:

As Figuras 19 e 20 correspondem ao subgrupo A/Oliva, e as Figuras 21 e 22 correspondem ao subgrupo B/Oliva.

Os resultados refletem novamente a importância de um estímulo satisfatório para a formação das células decíduais. Embora os pesos totais dos úteros dos animais, cujo estímulo mecânico foram produzidos pelo óleo de oliva, tem-se nas Figuras 19 e 20, uma área decidual equivalente às dos demais grupos. Isto se deve ao fato de que foram processados os sítios de decidualização, sendo estes em número reduzido ou menos expressivos com a utilização do óleo de oliva.

Figura 7: Útero controle padronização – Macho vasectomizado. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar o mesométrio (MS), luz uterina (L).

Figura 8: Útero controle padronização – Macho vasectomizado. Coloração H.E. Aumento 138X. Observar o mesométrio (MS), luz uterina (L), miométrio (M) e estroma endometrial (EE). Perceba proliferação celular abaixo da luz uterina, característico de útero em diestro.

Figura 9: Útero controle padronização – Método cotonete. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar mesométrio (MS), luz uterina (L).

Figura 10: Útero controle padronização – Método cotonete. Coloração H.E. Aumento 138X. Observar mesométrio (MS), luz uterina (L), miométrio (M) e estroma endometrial (EE). Perceba proliferação celular abaixo da luz uterina, característico de útero em diestro.

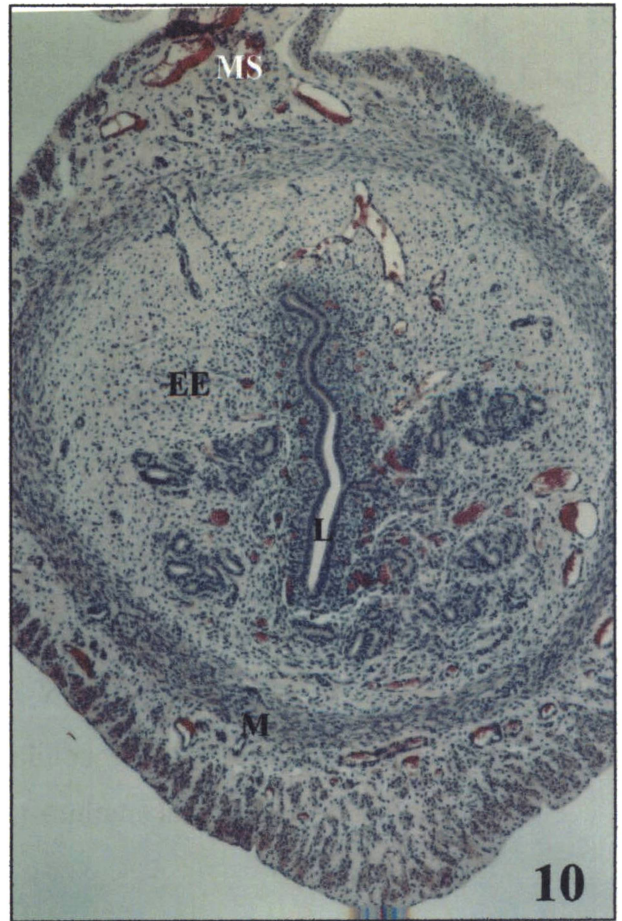
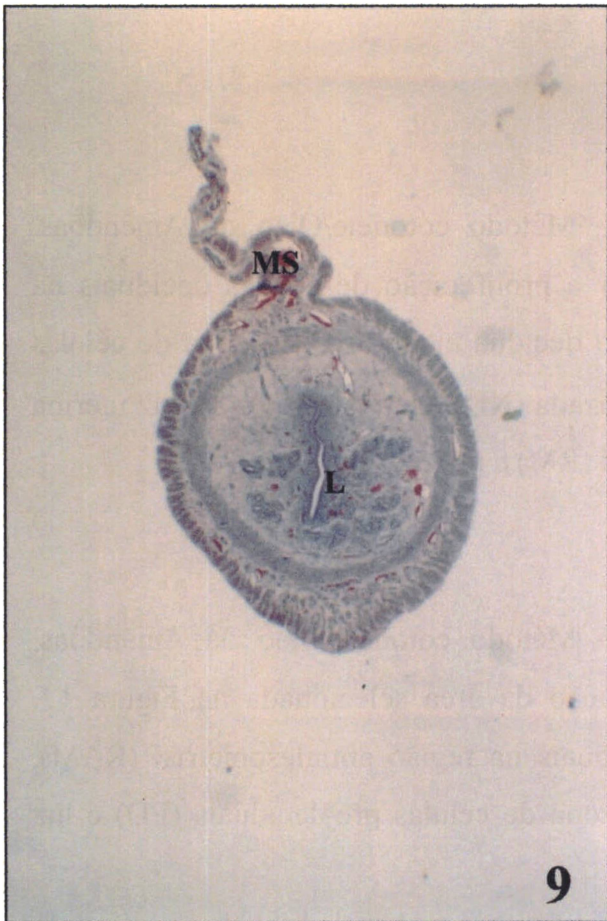
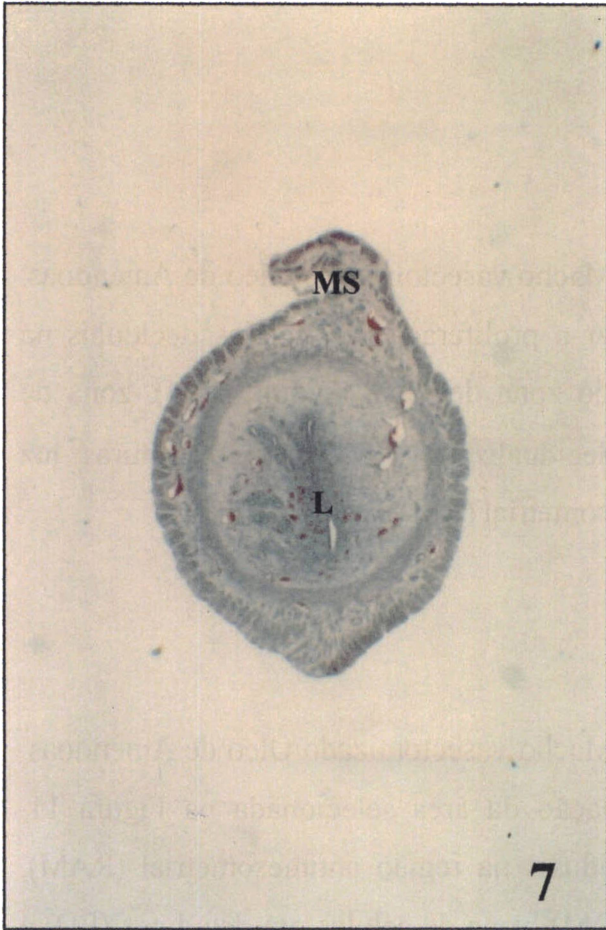


Figura 11: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), formando zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND). Outras estruturas: luz uterina (L), mesométrio (MS), região mesometrial (RM) e miométrio (M).

Figura 12: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 138X. Ampliação da área selecionada na Figura 11. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), evidenciando a zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e luz uterina (L).

Figura 13: Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), formando decídua madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e região não decidualizada (ND). Outras estruturas: luz uterina (L), mesométrio (MS), região mesometrial (RM) e miométrio (M).

Figura 14: Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Amêndoas. Coloração H.E. Aumento 138X. Ampliação da área selecionada na Figura 13. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), evidenciando a decídua madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e luz uterina (L).

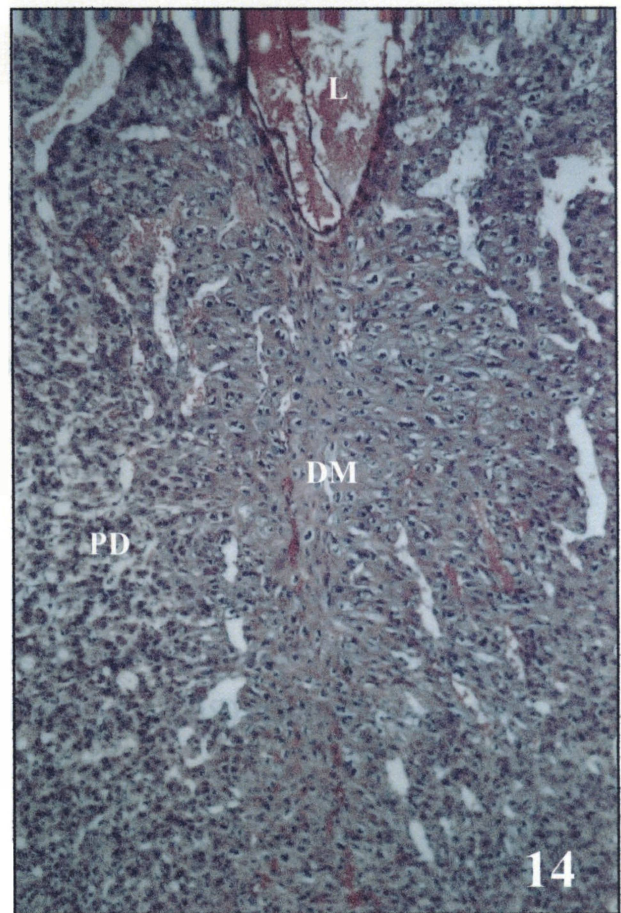
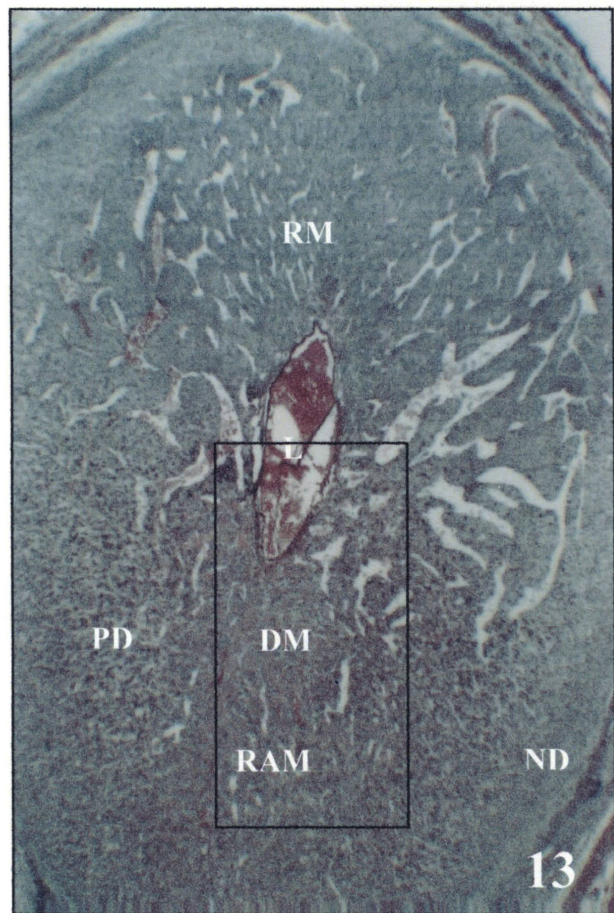
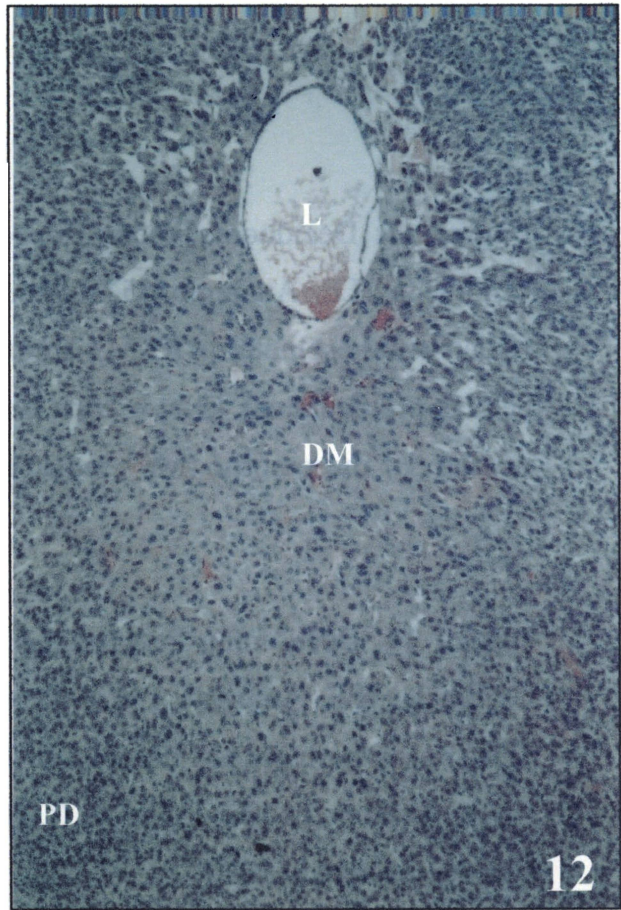
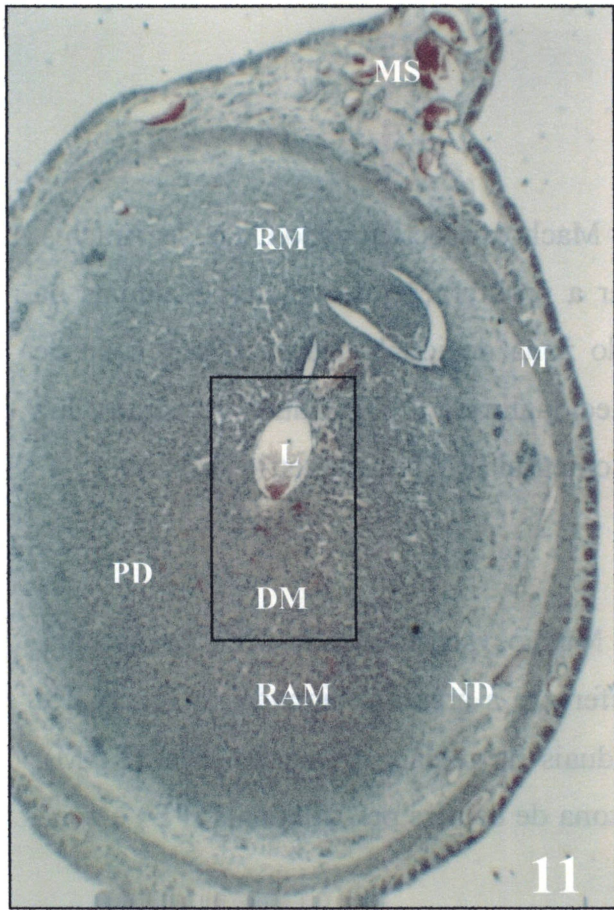


Figura 15: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), formando zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND). Outras estruturas: luz uterina (L), mesométrio (MS), região mesometrial (RM) e miométrio (M).

Figura 16: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 138X. Área referente à área selecionada na Figura 15. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), formando zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND).

Figura 17: Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), formando zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND). Neste corte a região mesometrial (RM) apresenta-se ricamente vascularizada. Outras estruturas: luz uterina (L) e miométrio (M).

Figura 18: Deciduoma Padronização – Método cotonete/Óleo de Arachis. Coloração H.E. Aumento 138X. Observar a zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD), zona não decidualizada (ND) e luz uterina (L).

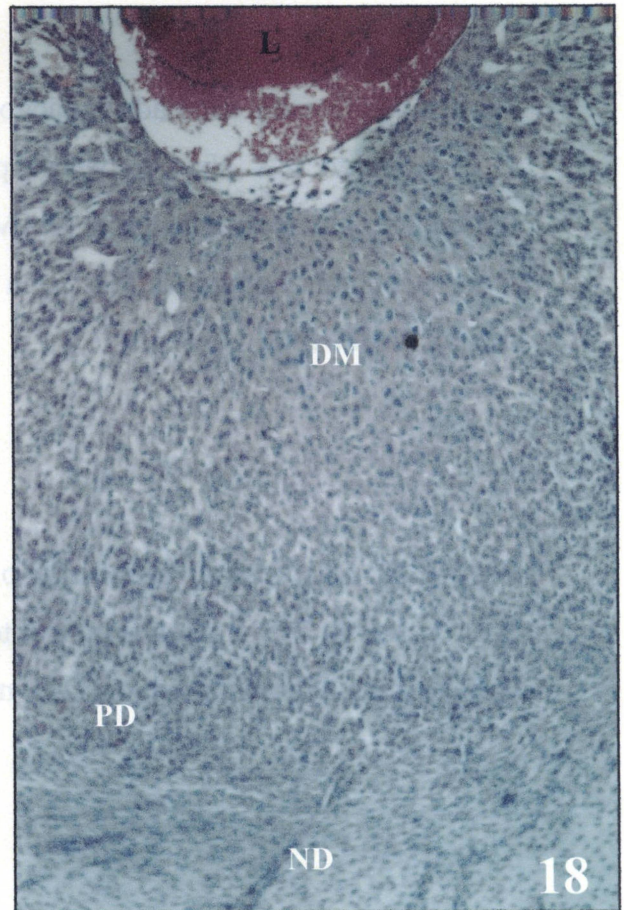
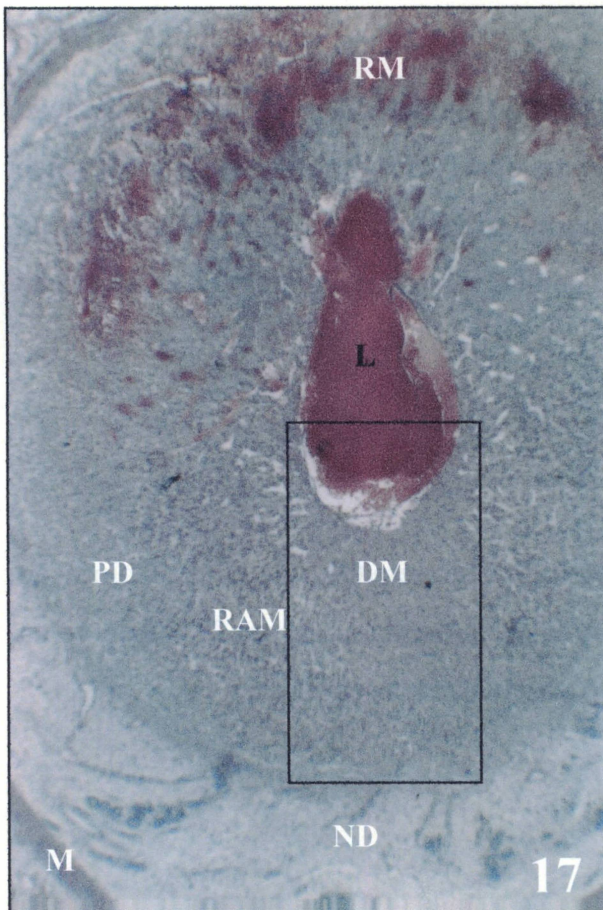
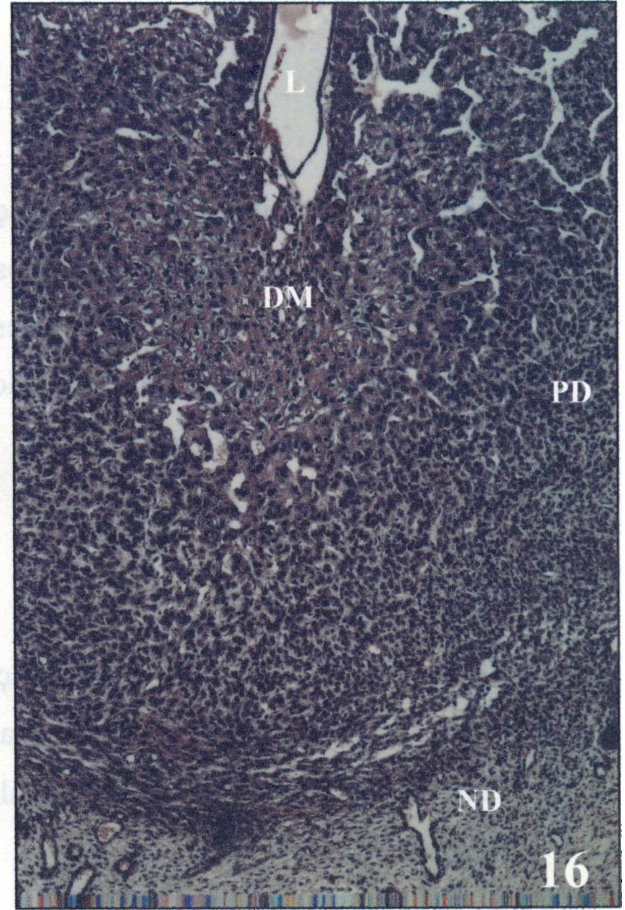
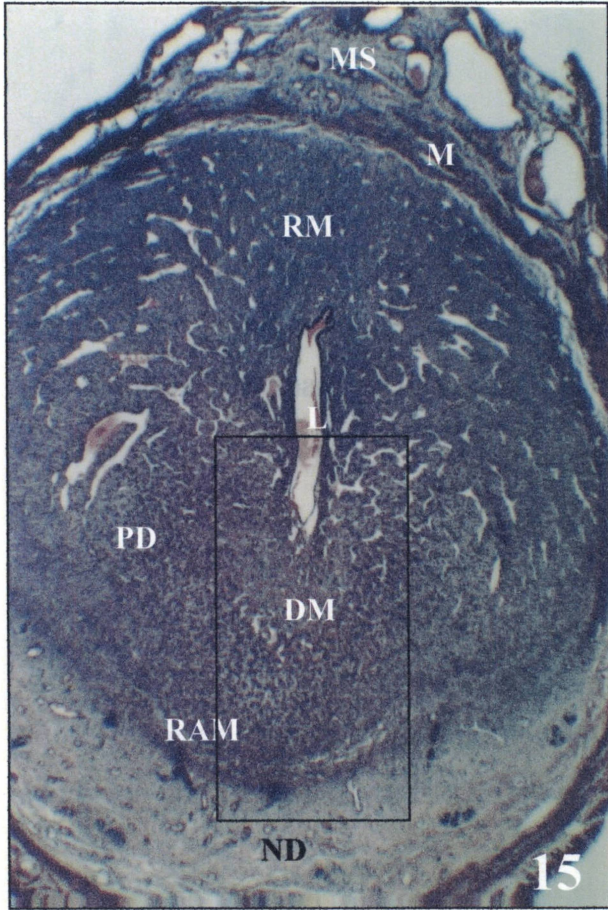
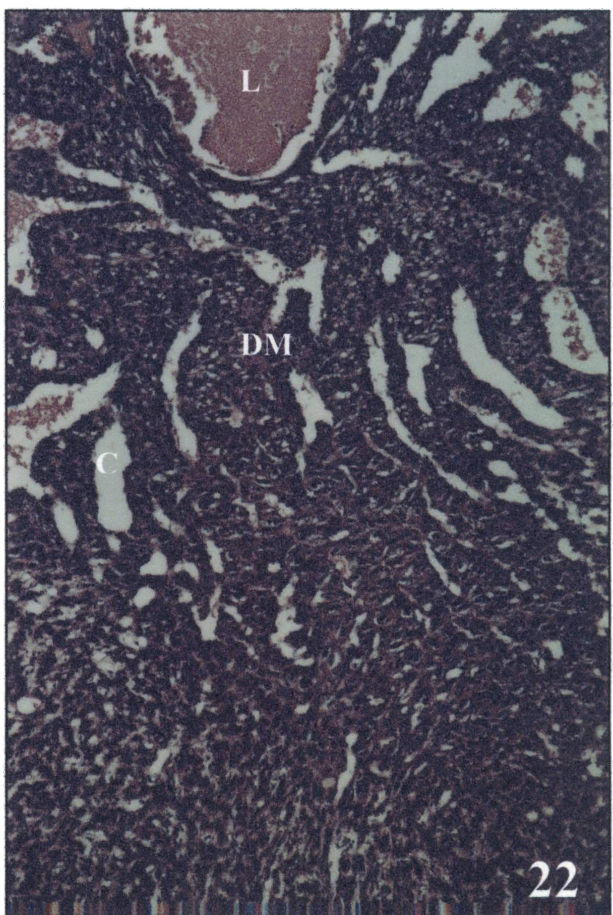
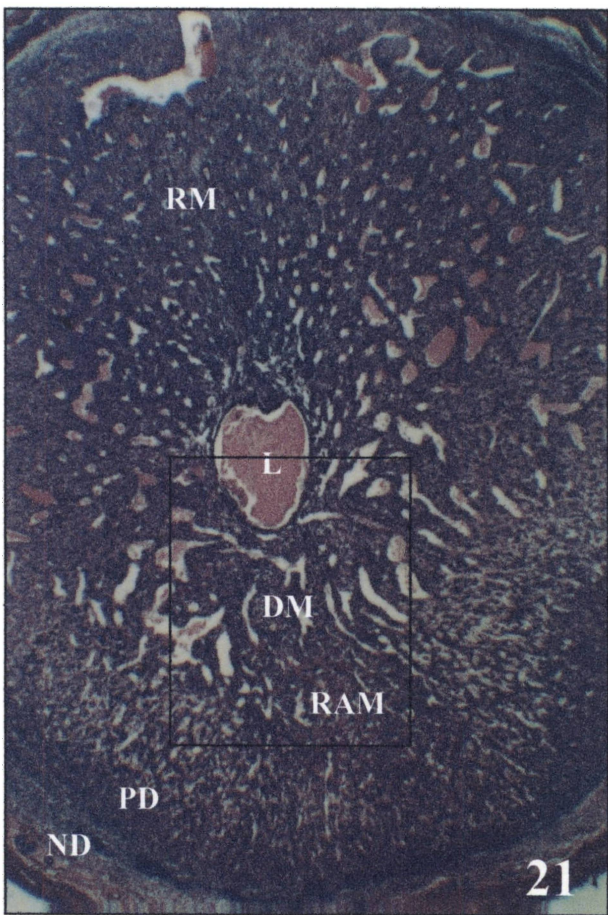
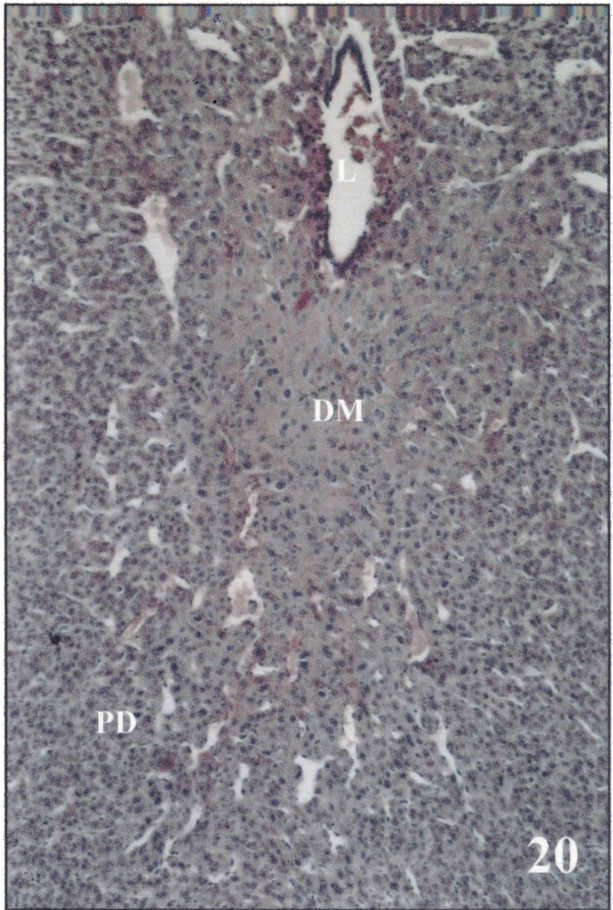
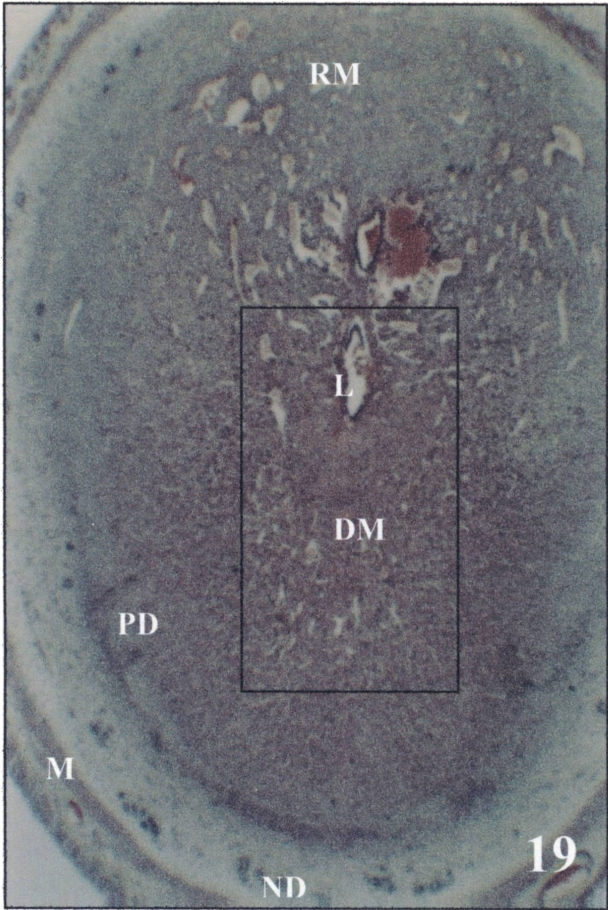


Figura 19: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar a proliferação de células decíduais na região antimesometrial (RAM), apresentando zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND). Observe neste corte a luz uterina (L) e miométrio (M).

Figura 20: Deciduoma Padronização – Macho vasectomizado/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 138X. Na região antimesometrial (área selecionada na Figura 19), observe a zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e luz uterina (L).

Figura 21: Deciduoma Padronização – Método Cotonete/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 55X. Neste espécime podemos observar o processo decidual intenso tanto na região antimesometrial (RAM) quanto na mesometrial. A RAM apresenta a zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona não decidualizada (ND).

Figura 22: Deciduoma Padronização – Método Cotonete/Óleo de Oliva. Coloração H.E. Aumento 138X. Área semelhante à área selecionada na figura 21. Observe na RAM a zona decidual madura (DM) muito vascularizada (capilar C).



4.1.6 Discussão da Padronização da Técnica de Obtenção do Deciduoma

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver uma metodologia específica padronizada que utilizasse a menor quantidade possível de animais, não apenas pelo custo envolvido na manutenção destes, mas, principalmente por respeito às questões éticas que envolvem experimentos com animais. Além disso, de acordo com as condições de nosso laboratório, a padronização da metodologia de obtenção de deciduoma foi fundamental para 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 na dissertação de 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).

Devido ao fato de que os trabalhos utilizando tamoxifeno (TMX) no tratamento de ratos, para estudos de variações hormonais e modificações uterinas, oferecerem doses estabelecidas da droga, tanto para a ação estrogênica e quanto a antiestrogênica, optou-se pela utilização deste animal para a obtenção do modelo biológico adotado neste estudo.

A escassa literatura pertinente, além de outras variáveis, mostrou que, no caso do modelo em pseudogestação, era preferível manter a indução da mesma com machos vasectomizados, tal como era conduzida para camundongos. Além disso, para a indução do deciduoma, que nos camundongos era obtido pelo uso do óleo de amêndoas, passou-se a utilizar óleo de oliva, seguindo sugestão da literatura referida por DE FEO (1967).

Como pode ser constatado nos resultados (vide tabelas 2 e 3, gráficos 1 e 2), com as análises macroscópicas dos cornos uterinos e observações histológicas, ficaram evidentes que, em se tratando de nossas condições experimentais, nossos resultados não foram semelhantes aos obtidos por DE FEO (1967).

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, foi como constatado inicialmente em camundongos, o agente que causou a maior intensidade de reação decidual média, tanto para camundongos como para ratas. Vale salientar que nossos resultados vão de encontro aos obtidos por ANDRADE (1993) e ANDRADE et al., (1996).

Embora tenhamos obtido melhores resultados com o óleo de amêndoas, os experimentos com Tamoxifeno iniciaram-se antes da padronização e, para obtê-los, seguimos criteriosamente os resultados de DE FEO (1967). Não vemos problemas em apresentá-los, pois, embora apresente o menor valor em massa para a reação decidual em relação aos demais óleos, apresenta uma boa linearidade de resultados, o que nos permite afirmar se a droga fez ou não efeito sobre o útero sensibilizado.

A técnica de sensibilização utilizada nos animais tratados foi o acasalamento com machos vasectomizados, por considerarmos que ambas as técnicas eram eficazes na sensibilização, não sendo as alterações nesta etapa as responsáveis pelas alterações nos valores obtidos. Por questões de redução do número de animais para manuseio e facilidade de execução, esta técnica será futuramente substituída em nosso laboratório pela técnica de cotonete.

Conforme relatos da literatura, há várias sugestões de como proceder a obtenção de decíduomas. 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 tais metodologias foram impossíveis de se tornarem reproduzíveis e, portanto, difíceis de serem aplicadas em nosso laboratório, mais uma vez se destaca a importância do presente estudo.

4.2 TRATAMENTO DAS RATAS PSEUDOGRÁVIDAS COM TAMOXIFENO

De acordo com a literatura, os estudos referentes à ação do Tamoxifeno no útero se devem ao fato de que o mesmo tem sido utilizado em coquetéis hormonais para o aborto hormonalmente induzido, ou simplesmente como contraceptivo pós-coito. Uma das vias de inibição da gestação baseia-se no fato de que, para a implantação do blastocisto no útero, é necessária a preparação do endométrio uterino pela ação dos hormônios estrogênicos e do progesterona (RAVINDRANATH¹¹ et al., 1987; SENGUPTA¹² et al., 1989; PSYCHOYOS¹³ et al., 1987 apud DAO et al., 1996). Segundo estes autores, se tais hormônios tiverem sua ação bloqueada, poderão ser efetivos na interrupção da prenhes. DAO et al. (1996) demonstraram em seus estudos, que antiestrogênicos impedem a implantação do blastocisto quando administrados pós-coito, suportando a hipótese de que o estrógeno é essencial na preparação do útero para a implantação do blastocisto. Um outro mecanismo possível (HARPER; WALPOLE, 1967) sugere que os antiestrogênicos com atividade parcial agonista (como o tamoxifeno), devem impedir ou modificar o mecanismo da implantação por acelerar o transporte dos zigotos na tuba uterina assim como o estradiol naturalmente o faz.

Tendo como base tais informações, utilizando doses com efeitos agonista (0,1 mg/kg) ou antagonista (0,03 mg/kg), é possível estudar as alterações morfológicas ocorridas na reação decidual, pelo aporte ou supressão da atividade do estrogênio.

¹¹ RAVINDRANATH, N. MOUGDAL, N.R. Use of tamoxifen, an antiestrogen, in establish a need for estrogen in early pregnancy in bonnet monkey (*Macaca radiata*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81, p.317-336, 1987.

¹² SENGUPTA, J. GHOSH, D. Current concept of endometrial steroid-receptor interaction in early pregnancy and anti-implantation in primates. In: CP PURI, PFA VAN LOOK. **Hormones Antagonists for Fertility Regulation**. Bombay: Indian Society for the Study of Reproduction and Fertility. 1989. p. 183-198.

¹³ PSYCHOYOS, A.; PRAPAS, I. Inhibition of egg development and implatation in rats after post-coital administration of the progesterone antagonist RU 486. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 80, p. 487-491, 1987.

4.1.1 Tratamento das Ratas Pseudográvidas com Tamoxifeno na Dose de 0,03mg/kg

Nos modelos experimentais testados, observaram-se diferenças marcantes com as alterações da dose. LEÃO (2002) em análises morfométricas de cortes do 6º dia de gestação (DG) de sítios de implantação de ratas grávidas tratadas com tamoxifeno na dose de 0,03 mg/kg/dia (nos dias 1, 2 e 3 da gestação), demonstrou redução da zona decidual madura e, que tal alteração não impediu o sucesso reprodutivo, embora tenha ocorrido uma certa redução, tanto na área ocupada pelas células deciduais maduras como também redução no número de sítios de implantação.

Quando analisados os eventos moleculares quanto à redução da zona decidual madura, é possível sugerir a ação antiestrogênica do TMX em baixas doses (HARPER; WALPOLE, 1966). No entanto, quando a gestação foi levada a termo, observou-se o sucesso da gestação, devido ao fato de que, com a presença do blastocisto implantado, o trofoblasto mantém o corpo lúteo pela ação de gonadotrofinas, fazendo com que haja estrógeno para a manutenção da gestação.

Na ausência de implantação embrionária, como na pseudogestação, nossos resultados obtidos com animais tratados com 0,03 mg/kg de Tamoxifeno nos dias 1, 2 e 3, demonstraram, no 8º DPG, ausência total da reação decidual (vide Figuras 25 e 26), quando comparados ao controle (Figuras 23 e 24).

É possível observar na Figura 26, que o útero apresenta o aspecto de um útero em diestro ou de sítio de interimplantação (não decidualizado), no entanto, apresentado-se mais edemaciado. A grande celularidade abaixo do epitélio do lúmen uterino também aponta para este aspecto. É importante frisar o fato do útero apresentar-se em diestro e edemaciado, pois confirma a estimulação da pseudogestação, de forma que a inibição da decidualização fica relacionada apenas com a administração da dose antiestrogênica de Tamoxifeno.

A razão pela qual as células não se decidualizaram é discutível. Como os fibroblastos endometriais possuem receptores para estrógeno, estes dependem do

hormônio para se multiplicarem e diferenciarem em células decíduais. SHELESNYAK e KRAICER¹⁴ (1963) (apud LOBEL, 1965) propuseram que o início da secreção do estrógeno pelo ovário ocorre no 3º DPG. WATSON et al. (1974) descrevem que pequenas concentrações de estradiol e progesterona estavam presentes nos 1º e 2º DG, aumentando as concentrações de estradiol na noite do 3º DG, alcançando um máximo de concentração às 22:00 horas, mantendo-se constante por 8 horas, e declinando entre as 6:00 e 10:00 horas do 4º DG.

Existem diferentes possibilidades quanto ao mecanismo correto dos eventos moleculares. MOURITS et al. (2001) cita MOSSELMAN¹⁵ (1996), o qual descobriu uma segunda isoforma do receptor β de estrógeno. Este é mais expresso em diferentes tecidos do que o receptor alfa. Ambos podem estar presentes no mesmo tecido, porém apresentando diferentes propriedades ligantes. Estas diferenças devem contribuir para a ação seletiva dos moduladores de receptores de estrógeno nos diferentes tecidos. No entanto, em um mesmo tecido, o Tamoxifeno pode ter efeitos estrogênicos e antiestrogênicos. Assim sendo, temos a ação direta do Tamoxifeno sobre os receptores estrogênicos (HUNTER; EVANS, 1999), causando uma modulação negativa, como no estudo em questão, impedindo a transformação dos fibroblastos endometriais em células decíduais.

HUNTER e EVANS (1999) citam o trabalho de GRONEMEYER¹⁶ et al. (1992), o qual sugere que a ação antagonista do TMX se deve pelo mesmo ocupar o sítio ligante do hormônio (TAF-2 de Transcription Activation Functions-2) no receptor e no complexo de transporte receptor/Tamoxifeno para o núcleo, portanto, ambos depletam a concentração citoplasmática de receptores de estrógeno disponíveis para a ligação do hormônio impedindo a ativação de genes ativados por estrógenos.

¹⁴ SHELESNYAK, M.C.; KRAICER, P.F. In: **Delayed implantation**. Enders A.C., Ed. Chicago and London, 1963

¹⁵ MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 392, p. 49-53, 1996.

¹⁶ GRONEMEYER, H.; BENHAMOU, B.; BERRY, B.; BOCQUEL, M.T.; GOFFLO, D.; GARCIA, T. Mechanisms of antihormone action. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v.41, p. 217-221, 1992.

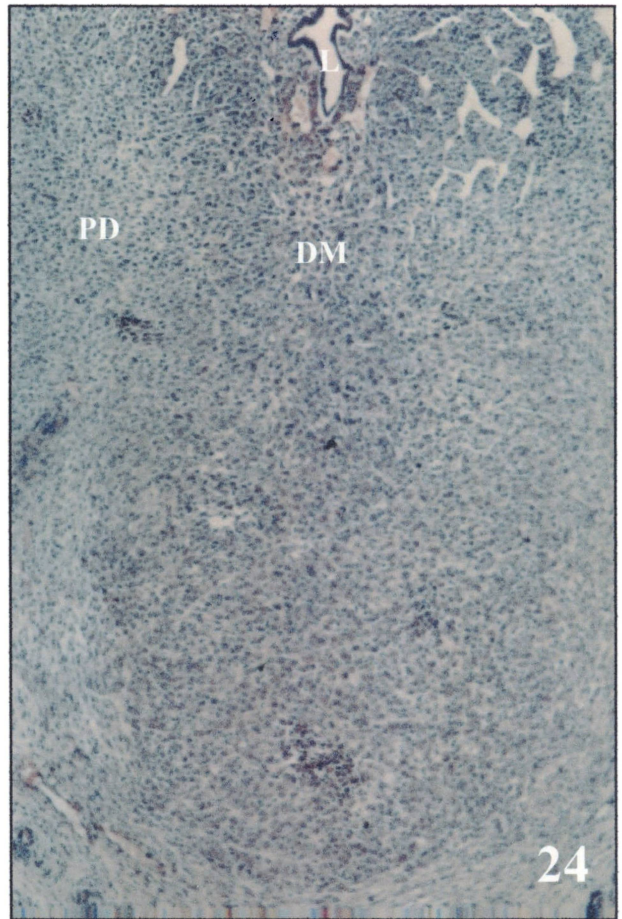
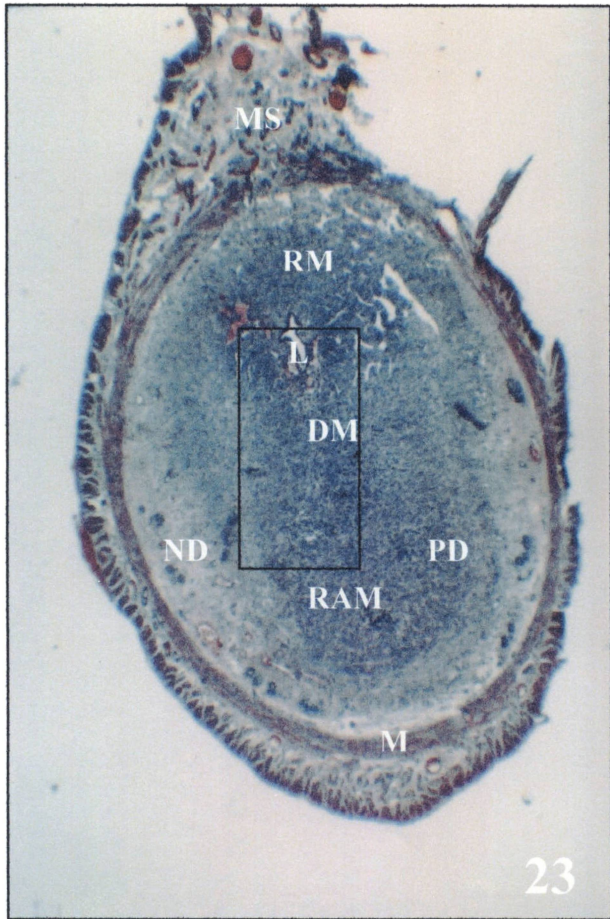
Com base nestas informações, podemos concluir que não ocorre decidualização no endométrio de roedores tratados com 0,03 mg/kg de TMX devido à sua ação antiestrogênica. Possivelmente o Tamoxifeno age impedindo a produção de receptores para progesterona, a qual é responsável pela diferenciação dos fibroblastos endometriais em células deciduais.

Figura 23: Deciduoma controle. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar o mesométrio (MS), região mesometrial (RM), região atimesometrial (RAM) decidualizada, possuindo zona decidual madura (DM), zona pré-decidual (PD) e zona não decidualizada. Observe ainda o miométrio (M) e a luz uterina (L).

Figura 24: Deciduoma controle. Coloração H.E. Aumento 138X. Ampliação da área selecionada na Figura 23. Observe a presença da zona decidual madura (DM) e zona pré-decidual (PD).

Figura 25: Útero Tratado com 0,03 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 55X. Observar ausência de reação decidual, estando o útero com características de diestro. Mesométrio (MS), luz uterina (L) e miométrio (M).

Figura 26: Útero Tratado com 0,03 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 138X. Uma proliferação de fibroblastos endometriais pode ser observada próxima ao epitélio uterino. O estroma endometrial (EE) apresenta-se edemaciado, característico do processo de pseudogestação.



4.2.2 Tratamento das Ratas Pseudográvidas com Tamoxifeno na Dose de 0,1mg/kg

Uma hipótese anteriormente aceita para o efeito abortivo do Tamoxifeno em ratas na dose de 0,1 mg/kg, foi descrita por WATSON e ALAM (1976). Os autores sugeriram que: 1) devido ao fato de que implantação em rata ser precedida por uma onda de estrógeno entre as 22:00 horas no dia 3 e 8:00 horas no dia 4 de gestação, e que a implantação e a onda de estrógeno podem ser atrasados em pelo menos 20 horas pela administração oral de uma dose única de 0,1 mg/kg de TMX no 2ºDG; e 2) nenhuma dose de Tamoxifeno afeta os níveis plasmáticos de progesterona em animais grávidos, enquanto altas doses de Tamoxifeno possuem um leve efeito sobre os níveis plasmáticos e pituitários de hormônio luteinizante (LH), postulou-se que o Tamoxifeno poderia ter um efeito direto no ovário e a propriedade antifertilidade se deveria principalmente pela capacidade de inibir a síntese e/ou secreção de estradiol pelos ovários.

O receptor de estrógeno possui, no entanto, um segundo sítio de ativação que é ativado tanto pelo estrógeno quanto pelo Tamoxifeno. Este sítio, chamado TAF-1, é promotor e tipo celular específico, e sua ação é independente da ligação do hormônio ao sítio TAF-2, sendo responsável pelos efeitos estrogênicos.(HUNTER; EVANS, 1999)

Nos animais pseudográvidos e tratados com a dose de 0,1 mg/kg de TMX nos dias 1, 2 e 3, pode se perceber o efeito estrogênico do Tamoxifeno (vide Figuras 27 e 28), onde uma acentuada decidualização pode ser observada. Se comparado ao controle (Figuras 23 e 24), podemos observar que a reação decidual se apresentou de forma acentuada, apresentando uma espessa e centrífuga Zona Decidual Madura. Este resultado está de acordo com o que ocorre nos animais grávidos submetidos ao mesmo tratamento.

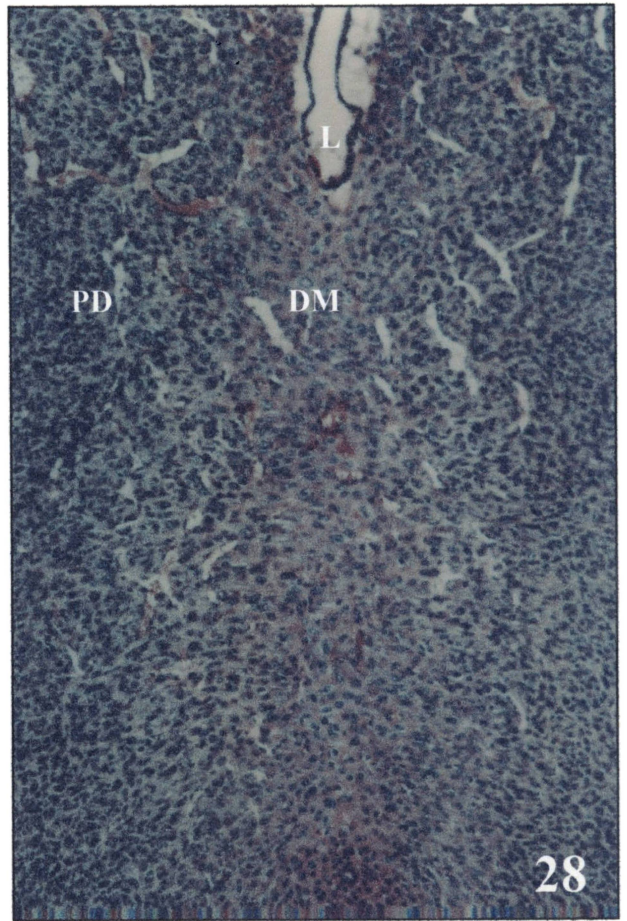
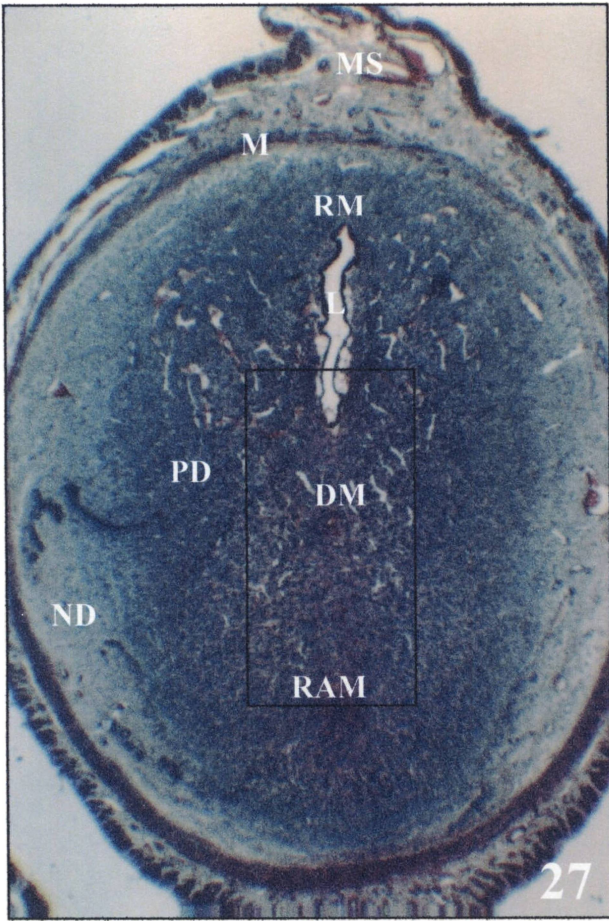
LEÃO (2002) descreveu um aumento significativo da Zona Decidual Primária, apontando para uma estimulação acentuada das células deciduais pela ação do Tamoxifeno na dose estrogênica de 0,1 mg/kg. Nestes animais, a gestação não chegou a termo, possivelmente devido à aceleração do transporte dos blastocistos na tuba uterina,

perdendo estes, a janela de implantação. Poucos blastocistos permaneceram na tuba uterina no momento da janela de implantação, de forma que estes animais apresentavam sítios de implantação bem decidualizados e que puderam ser estudados.

Provavelmente este efeito se deveu à ação do TMX nos receptores TAF-1 presentes no útero da rata, não dependendo, desta forma, da concentração plasmática de estrógeno, que, segundo WATSON e ALAN (1976) está reduzida.

Figura 27: Útero Tratado com 0,1 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 55X. Comparando com o controle (Figura 23), percebe-se intensa reação decidual. Observe na região antimesometrial (RAM) a presença da zona decidual madura (DM), zona de células pré-decíduais (PD) e zona de células não decidualizadas. Outras estruturas: mesométrio (MS), miométrio (M) e luz uterina (L).

Figura 28: Útero Tratado com 0,1 mg/kg de Tamoxifeno. Coloração H.E. Aumento 138X. Observe na região antimesometrial (RAM) (área selecionada na Figura 27) a presença da zona decidual madura (DM) e zona de células pré-decíduais com intensa proliferação celular.



5. CONCLUSÕES

5.1 QUANTO À PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

- a) Os métodos de sensibilização hormonal, ou seja, o acasalamento com o macho vasectomizado e o método cotonete são ambos eficazes para a formação do estado de pseudogestação;
- b) O óleo de amêndoas, em nossa prole de animais e condições laboratoriais, permitiu uma maior decidualização do útero em pseudogestação, não sendo compatível com os resultados obtidos por DE FEO (1967);
- c) O óleo de oliva, embora desenvolva um decíduoma com massa menor que o óleo de amêndoas, oferece uma constância em seus resultados, o que facilita os parâmetros de comparação em tratamentos experimentais comparativos, tais como o executado nesta dissertação.
- d) Para novos estudos, o Laboratório de Biologia do Endométrio de Roedores utilizará a metodologia aqui padronizada, analisando os objetivos individuais de cada projeto de pesquisa para decidir qual método de estimulação e óleo de indução deverá ser utilizado.

5.2 QUANTO AOS RESULTADOS OBTIDOS NAS RATAS PSEUDOGRÁVIDAS TRATADAS COM TAMOXIFENO

- a) O Tamoxifeno em baixas doses (0,03 mg/kg), por sua ação antiestrogênica, impede a reação decidual em ratas pseudográvidas;
- b) O Tamoxifeno em altas doses (0,1 mg/kg), por sua ação estrogênica, acentua a reação decidual (quando comparado ao controle), certamente por favorecer a sensibilização dos fibroblastos endometriais, de forma que os mesmos estejam receptivos ao progesterona que será responsável pela transformação decidual.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Morphology of the decidua. In: **Blastocyst implantation**. K Yoshinaga, Adams Publishing Group, Ltd., Boston, p. 127-133, 1989.

ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 166, p. 263-274, 1983.

ABRAHAMSOHN, P.A.; ZORN, T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, n. 266, p. 603-628, 1993.

ANDRADE, C.G.T.J. **Decidualização Induzida de Camundongas pseudográvidas: estudo morfológico ultraestrutural**. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado em: Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

ANDRADE, 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. **Anatomical Record**, New York, v. 244, p. 316-326, 1996.

BARKAI, U.; KIDRON, T.; KRAICER, P.F. Inhibition of decidual induction in rats by clomiphene and tamoxifen. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 46, n. 4, p. 733-739, 1992.

BRIDGMAN, J. A morphological study of the development of the placenta of the rat. In. An outline of the development of the placenta of the white rat. **Journal of Morphology**, New York, v. 83, p. 61-85, 1948.

DAO, B.; VANGE, G.; MARSHALL, A.; BARDIN, C.W.; KOIDI, S.S. Anti-implantation activity of antiestrogens and mifepristone. **Contraception**, New York, v. 54, p. 253-258, 1996.

DE FEO, V.J. Decidualization. In: WYNN, R.M. **Cellular Biology of the Uterus**. Ed., Amsterdam, North Holland, 1967. p.192-291.

DUPONT, H.; LARRUE, J.; DULUC, A.J.; MAYER, G. Le d'eciduome expérimental chez la ratte: étude histoenzymatique. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, Paris, v. 169, p. 1204-1209, 1976.

ENDERS, AC.; SCHLAKE,S. A Morfological analysis of the early implantation stages in the rat. **American Journal of Anatomy**, New York, p. 185-226, 1967.

FINN, A.C. The implantation reaction. In: WYNN, R.M. **Biology of the Uterus**. ed. New York: Plenum Press, 1977. p. 245-308.

FINN, C.A.; KEEN, P.M. The induction of deciduomata in the rat. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 11, p. 673-682, 1963.

FINN, C.A.; MCLAREN, A. A sudy of the early stages of implantation in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 13, p. 259-267, 1967.

GILMAN, A. G. **The Pharmacological Bases of Terapeutics**. 9. ed. New York: McGrawHill, 1996. p. 1275-1276.

GLASSER, S.R.; JULIAN, J.A. Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 35, p. 463-476, 1986.

GRECA, C.P.S. Estudo citoquímico ultra-estrutural associado a tratamento enzimático da matriz extracelular fundamental do endométrio de camundongas. São Paulo, 1996, 130p. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.

HARPER, M.J.K.; WALPOLE, A.L. Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 37, p. 83-92, 1967.

HARTMANN, I. **Localização Ultra-Estrutural de Sítios Aniônicos na Matriz Extracelular da Glândula Submandibular de Rato em Diferentes fases de Desenvolvimento.** Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em: Biologia Celular – Morfologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HUNTER, S.M.; EVANS, M. Non-surgical method for the induction of delayed implantation and recovery of viable blastocysts in rats and mice by the use of tamoxifen and depo-provera. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 52, p. 29-32, 1999.

IOANNIDIS, N. Lipidosis induced in rat uteri by high doses of tamoxifen. **Annals of Anatomy**, Jena, v. 180, n. 4, p. 315-319, 1998.

KAPLAN-KRAICER, R.; KOSTOVETSKY, I.; BARDIN, C.W.; SHALGI, R. Tamoxifen and RU39411 synergize with Mifepristone to produce preimplantation pregnancy loss by increasing embryo transport (Rat). **Contraception**, New York, v. 56, p. 367-373, 1996.

KENNEDY, T.G. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 16, p. 286-291, 1977.

KISALUS, L.L.; KERR, J.C. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycan in human decidual cell secretory bodies and placental fibrinoid. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 39, p. 419-430, 1988.

KREHBIEL, R.H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during pregnancy and in the production of deciduomata. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 10, p. 212-238, 1937.

LEÃO, G.M.C. **Análise Histológica e Imunohistoquímica do Endométrio de Ratas Grávidas Tratadas com Tamoxifeno.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em: Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LOBEL, B.L.; TIC, L.; SHELESNYAK, M.C. Studies on the mechanisms of nidation. XVII Hystochemical analysis of decidualization in the rat. **Acta Endocrinologica**, Oslo, v. 50, p. 469-485, 1965.

LOBEL, B.L.; LEVY, E.; SHELESNYAK, M.C. Studies on the mechanisms of nidation. XXXIV Dynamics of cellular interation during progestation and implantation in the rat. **Acta Endocrinologica**, Oslo, v. 56, Suppl. 123, p. 7-109, 1967.

MISHELL, D.R.J.; JAIN, J.K.; BYRNE, J.D.; LACARRA, M.D.C. A medical method of early pregnancy termination using Tamoxifen and Misoprostol. **Contraception**, New York, v. 58, p. 1-6, 1998.

MONICE, F.L. **Involução do Deciduoma Induzido em Camundongos Pseudográvidos: estudo estrutural, ultraestrutura e imunocitoquímico**. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado em: Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

MORRIS, J.E.; POTTER, S.W.; GAZA-BULSECO, G. Estradiol induces an accumulation of free heparan sulfate glycosaminoglycan chains in uterine epithelium. **Endocrinology**, Bethesda, v.122, n.1, p. 242-253, 1988.

MOURITS, M.J.E.; DE VRIES, E.G.E.; WILLEMSE, P.H.B.; TEN HOOR, K.A.; HOLLEMA, H.; VAN DER ZEE, A.G.J. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v. 97, n. 5, p. 855-866, 2001.

MURO, M.D. **Localização Imunocitoquímica de Laminina e Fibronectina na Decídua e no Deciduoma de Camundongos Fêmeas**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em: Biologia Celular – Morfologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

O'SHEA, J.; KLEINFELD, R.G.; MORROW, H.A. Ultrastructural of decidualization in the pseudopregnant rat. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 166, p. 271-298, 1983.

PAGANO,G.; BIASI, A. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. **Life Sciences**, New York, v. 68, p. 1735-1749, 2001.

PARR, E.L.; YOUNG, L.H.Y.; PARR, M.B.; YOUNG, J.D. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 145, p. 2365-2372, 1990.

PARR, M.B.; PARR, E.L. Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 34, p. 393-403, 1986.

PARR, M.B.; PARR, E.L. The implantation reaction. In:WYNN, R.M; JOLLIE, W.P. **Biology of the Uterus**. New York: Plenum Medical Book, 1989. p.233-277.

POULET, F.M.; ROESSLER, M.L.; VANCUTSEM, P.M. Initial uterine alterations caused by developmental exposure to tamoxifen. **Reproductive Toxicology**, New York, v. 11, n. 6, p. 815-822, 1997.

PSYCHOYOS, A. Hormonal control of ovoimplantation. **Vitamins and Hormones**, New York, n.31, p.201-256, 1973.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 366-367.

ROGERS, P.A.W.; MURPHY, C.R.; GANNON, B.J. Changes in the spatial organization of the uterine vasculature during implantation in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 65, p. 211-214, 1982.

SANANES, N.; BAULIEU, E. E.; LE GOASCOGNE, C. Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 6, p. 153-158, 1976.

SHELESNYAK, M. C. Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.170, p. 522-527, 1952.

THE MERCK Index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals. 11.ed. Rahway: Merck, 1989. p. 1430.

PHARMACOPEIA of the United States of America: Informacion de Medicamentos. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1989. p. 1999-2000.

WATSON, J.; ALAM, M.; ANDERSON, F.B.; HEALD, P.J. The effect of ICI 46474 (Tamoxifen) on hormone concentrations during early pregnancy in the rat. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 2, p. 982-983, 1974.

WATSON, J.; ALAM, M. Oestrogen synthesis during delayed implantation in the rat. **Contraception**, New York, v. 13, p. 101-107, 1975.

WELSH, A.O. ; ENDERS, A.C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 172, p. 1-29, 1985.

WELSH, A.O.; ENDERS, A.C. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of rat. **Anatomical Records**, New York, v. 217, p. 203-219, 1987.

WIEBE, E.R. Tamoxifen compared to methotrexate when used with misoprostol for abortion. **Contraception**, New York, v. 59, p. 265-270, 1999.

WISEMAN, H.; DUFFY, R. Steroids, steroids receptor and disease. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 146-147, 2001.

ZORN, T.M.T.; OLIVEIRA, S.F.; ABRAHAMSOHN, P.A. Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidual cells. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 103, p. 23-33, 1990.

