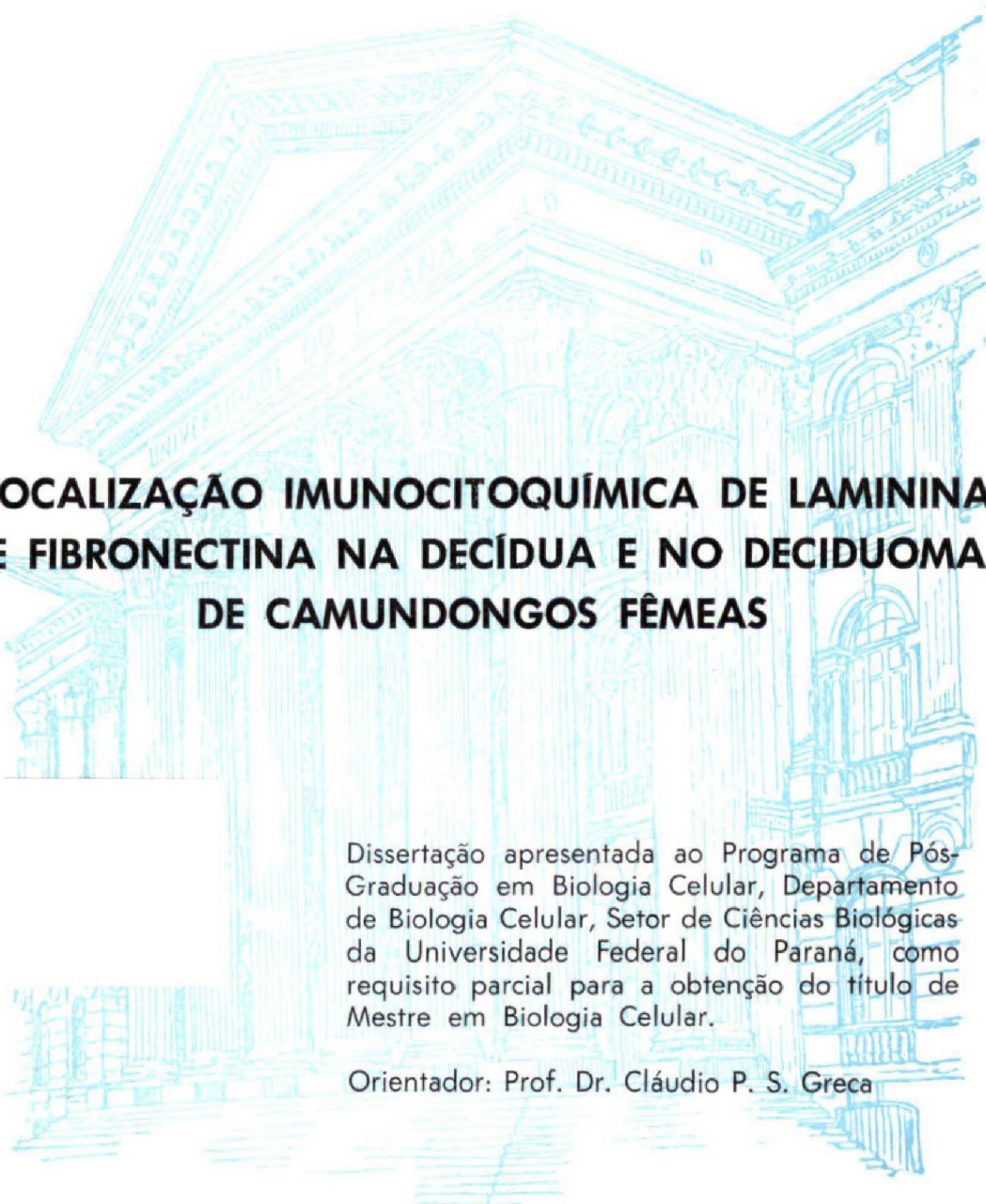


MARISOL DOMINGUEZ MURO



**LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE LAMININA
E FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA
DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

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. S. Greca

CURITIBA

2000

MARISOL DOMINGUEZ MURO

**LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE LAMININA
E FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA
DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

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. S. Greca

CURITIBA

2000

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado
“ **LOCALIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE LAMININA E FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS.**”, de autoria da Pós-Graduanda Marisol Dominguez Muro, e composta pelos Professores: Dr. Cláudio de Paula Soares Greca; (como Orientador e Presidente); Dr^a. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade (UEL); Dra. Cloris Ditzel Faraco (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Cláudio de Paula Soares Greca, nota 10,0 (*Dej*); Dr^a. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade, nota 10,0 (*Dej*); Dra. Cloris Ditzel Faraco, nota 10,0 (*Dej*). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata foi: APROVADA com a nota 10,0 (*Dej*), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 05 de Outubro de dois mil.



Dr. Cláudio de Paula Soares Greca



Dr^a. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus Andrade



Dr^a. Cloris Ditzel Faraco

DEDICATÓRIA

À minha família e a todos os meus colegas de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio P. S. Greca pela orientação, estímulo e amizade. Desde o momento em que fui aceita como orientanda, me fez sentir no seu laboratório uma continuidade do meu lar. Agradeço sobretudo a grande oportunidade que me proporcionou de participar deste ambiente acadêmico que muito contribuiu para minha vida profissional e pessoal.

Aos meus colegas do laboratório de Matriz Extracelular, Luiz Bianchini e Gabriel M. Carneiro, pela competência, companheirismo e grande amizade que demonstraram. Também agradeço a Carlos A Micheloto pela amizade e grande auxílio prestado no laboratório, assim como a Vivian Torrencilha e a Michele Cardozo, que também tiveram importante participação neste trabalho. Meus agradecimentos também ao Edson, Amarildo, João e a todos os colegas do mestrado. Guardarei boas lembranças deste tempo que juntos passamos.

À Professora Telma M. T. Zorn, Prof. Paulo Abrahamsohn, Doutorando Maurício Soto, e técnicas Cleusa Pellegrini e Ana Lucia Mota, do Laboratório de Matriz Extracelular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de freqüentar o laboratório estando todos gentilmente dispostos a prestar qualquer auxílio.

À Professora Célia Guadalupe T. de Jesus Andrade pela grande colaboração científica e pela presença amiga.

A todos os professores que ministraram aulas durante este período de mestrado, foi muito gratificante este tempo que aqui passei.

A todos os funcionários do biotério, especialmente ao Cândido J. Pereira, Izelen Ivanoski e Terezinha de Jesus Andrade, sempre prontos e dispostos a auxiliar em qualquer momento.

Ao Dr. Michele Caputto minha imensa consideração e estima.

Aos meus amigos do Laboratório Municipal de Curitiba, especialmente à chefia do mesmo nas pessoas da Dra. Tomoko Sasazawa Ito e Dra Beatriz Patriota que me deram imenso apoio para realização deste trabalho. O meu carinho especial aos amigos e colegas do Setor de Bacteriologia: Marisa, Sandro, Josira, Sueli, Silvio, Agnaldo e Aglaci, obrigada pelo grande companheirismo que existe entre nós.

À Emilia, Nanci, Carlos, Cida, Adriana e Rosangela, funcionários do setor de micologia do Laboratório do Hospital de Clínicas, pelo grande auxílio, estímulo e amizade.

Ao Professor Flávio Telles, fundador do setor de micologia do Hospital de Clínicas, pelo grande exemplo.

À Dra. Gisele P.F. Bordignon, chefe do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas, que exemplarmente estima o desenvolvimento científico de todos da Instituição.

Ao Professor Silvio Sanches pelo carinho com que desenvolve seus projetos no laboratório incentivando os jovens cientistas e pela disponibilidade em ceder os anticorpos utilizados neste trabalho.

Ao Herculano Salviano dos Reis Filho (Nino) pelo grande auxílio nas questões técnicas.

À Marlene, secretária da pós-graduação, pela constante disposição e gentileza com que atende os pós graduandos.

À Cecília Erthal, pelo grande auxílio na finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
LISTA DE REAGENTES.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 BIOLOGIA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA.....	1
1.1.1 Indução da Pseudogestação.....	4
1.2 MATRIZ EXTRACELULAR.....	5
1.2.1 Laminina.....	6
1.2.2 Fibronectina.....	7
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR DO ENDOMÉTRIO.....	9
1.4 IMUNOCITOQUÍMICA.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 VASECTOMIA DOS CAMUNDONGOS MACHOS PARA INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO.....	18
3.3 ACASALAMENTO PARA OBTENÇÃO DE FÊMEAS GRÁVIDAS E PSEUDOGRÁVIDAS.....	19
3.4 INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO.....	19
3.5 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE DECIDUALIZAÇÃO.....	20
3.6 PROCEDIMENTO PARA FIXAÇÃO E EMBLOCAGEM EM PARAFINA.....	21
3.7 PROCEDIMENTOS PARA IMUNOCITOQUÍMICA.....	22
4 RESULTADOS.....	25
4.1 ENDOMÉTRIO NULÍPARO.....	25
4.1.1 Morfologia do Endometrio Nulíparo na Fase Estro.....	25
4.1.2 Documentação fotográfica.....	26
4.1.3 Distribuição de Laminina e Fibronectina no Endométrio Nulíparo.....	28
4.1.4 Documentação Fotográfica.....	29
4.2 DIA 5 DA GESTAÇÃO E PSEUDOGESTAÇÃO.....	31
4.2.1 Morfologia da Decídua e do Deciduoma.....	31
4.2.2 Documentação Fotográfica.....	32
4.2.3 Distribuição de Laminina na Decídua e no Deciduoma.....	35
4.2.4 Documentação Fotográfica.....	36
4.2.5 Distribuição de Fibronectina na Decídua e no Deciduoma.....	39
4.2.6 Documentação Fotográfica.....	40
4.3 DIA 7 DE GESTAÇÃO E PSEUDOGESTAÇÃO.....	42
4.3.1 Morfologia do Endométrio na Decídua e no Deciduoma.....	42
4.3.2 Documentação Fotográfica.....	43
4.3.3 Distribuição de Laminina na Decídua e no Deciduoma.....	45
4.3.4 Documentação Fotográfica.....	46
4.3.5 Distribuição de Fibronectina na Decídua e Deciduoma.....	48
4.3.6 Documentação Fotográfica.....	49
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1 MORFOLOGIA DO ENDOMÉTRIO NÃO-GRÁVIDO, GRÁVIDO E PSEUDOGRÁVIDO.....	52
5.2 DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA.....	59
5.3 DISTRIBUIÇÃO DE FIBRONECTINA.....	63
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO NULÍPARO.....	26
1A - Visão panorâmica de corte transversal de útero nulíparo.....	26
1B - Maior aumento da região antimesometrial do endométrio nulíparo (257,8x).....	26
1C - Detalhe da região antimesometrial (551,7x).....	27
1D - Detalhe do estroma uterino (1379,4x).....	27
Figura 2: DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA NO ENDOMÉTRIO NULÍPARO.....	29
2A - Corte transversal seqüencial da região antimesometrial do útero (137,9x).....	29
2B - Corte negativo incubado na ausência do anticorpo primário.....	29
2C - Corte incubado na presença do anticorpo policlonal anti-laminina (137,9x).....	30
<u>Encarte:</u> Detalhe em aumento maior do estroma. (551,7x).....	30
2D - Corte incubado na presença do anticorpo policlonal anti-fibronectina (42,5x).....	31
<u>Encarte:</u> Detalhe em aumento maior do estroma endometrial. (551,7x).....	31
Figura 3: ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA NO DIA 5.....	32
3A - Decídua no dia 5 da gestação. (137,9x).....	32
3B - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. (55,1x).....	32
3C - Decídua no dia 5 da gestação.(170x) <u>Encarte:</u> Detalhe das células decíduais maduras. 1379,4x.....	33
3D - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. (551,7x) <u>Encarte</u> em aumento de 1379,4x.....	33
3E - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células pré-decíduais. (551,7x).....	34
3F - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células não-decidualizadas. (551,7x).....	34
3G - Deciduoma no dia 5 da gestação. Região de células pré-decíduais. (551,7x).....	34
3H - Deciduoma no dia 5 da gestação. Região de células não-decidualizadas. (551,7x).....	34
Figura 4: LAMININA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA NO DIA 5.....	36
4A - Visão panorâmica do corte transversal do útero grávido, incubado com anticorpo anti-laminina (55,1x).....	36
4B - Visão panorâmica do corte transversal do útero pseudográvido tratado com tripsina a 0,01% e incubado com o anticorpo anti-laminina (55,1x).....	36
4C - Região de células decíduais maduras na decídua. (551,7x).....	37
4D - Aumento maior da mesma região no deciduoma. (1379,4x).....	37
4E - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células pré-decíduais. (551,7x).....	38
4F - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células não-decidualizadas. (551,7x).....	38
4G - Deciduoma no dia 5 da gestação. Região de células pré-decíduais. (551,7x).....	38
4H - Deciduoma no dia 5 da gestação. Região de células não-decidualizadas. (551,7x).....	38

Figura 5: FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 5.....	40
5A - Decídua antimesometrial. (257,8x).....	40
5B - Corte do decíduoma antimesometrial tratado com tripsina a 0,01%. (257,8x).....	40
5C - Região de células decíduais maduras da decídua antimesometrial. (551,7x).....	41
5D - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada na decídua antimesometrial. (551,7x).....	41
5E - Região de células decíduais maduras do decíduoma. (551,7x).....	41
5F - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada no decíduoma antimesometrial. (551,7x)	41
Figura 6: ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA NO DIA 7.....	43
6A - Visão panorâmica da decídua antimesometrial. (55,1x).....	43
6B - Decíduoma antimesometrial. (55,1x).....	43
6C - Região de células decíduais maduras. (551,7x).....	44
6D - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada da decídua. (551,7x).....	44
6E - Região de células decíduais maduras do decíduoma. (551,7x).....	44
6F - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada do decíduoma. (551,7x).....	44
Figura 7: LAMININA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 7	46
7A - Visão panorâmica da distribuição de laminina na decídua. (551,7x).....	46
7B - Visão panorâmica da distribuição de laminina no decíduoma. (551,7x).....	46
7C - Região de células decíduais maduras na decídua. (551,7x). Encarte: Detalhe em aumento de 1379,4x.....	47
7D - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada na decídua. (551,7x).....	47
7E - Região de células decíduais maduras no decíduoma. (551,7x) Encarte: Detalhe em aumento de 1379,4x.....	47
7F - Região de células pré-decíduais no decíduoma. (551,7x).....	47
7G - Região de células não-decidualizadas no decíduoma. (551,7x).....	47
Figura 8: FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 7	49
8A - Visão panorâmica da decídua. (257,8x).....	49
8B - Visão panorâmica do decíduoma. (257,8x).....	49
8C - Região de células decíduais maduras da decídua. (551,7x).....	50
8D - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada na decídua. (551,7x).....	50
8E - Região de células decíduais maduras do decíduoma. (551,7x).....	50
8F - Região de células pré-decíduais e não-decidualizada no decíduoma. (551,7x).....	50
Tabela 1 :COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA PARA OS CORTES DE ÚTERO NULÍPARO E DA DECÍDUA E DECIDUOMA DOS DIAS 5 E 7 DE GESTAÇÃO E PSEUDOGESTAÇÃO.....	51

LISTA DE REAGENTES

- Ácido acético glacial PA – Merck.
- Anticorpo policlonal anti laminina – cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer – SP).
- Anticorpo policlonal anti fibronectina – Laboratório de matriz extracelular da UFPR, cedida pelo Prof. Silvio Sanchez.
- Anticorpo anti IgG de coelho produzido em jumento conjugado com peroxidase – Jackson Chemical, Co.
- Azul de Evans – Merck.
- BSA (bovine serum albumine) - Sigma Co.
- Cloreto de cálcio – Sigma Co.
- Clorofórmio PA – Merck.
- Diaminobenzidina (DAB) – Sigma Co.
- Etanol PA – Merck.
- Hematoxilina de Mayer Sigma Co.
- Óleo de amêndoa – Laboratório Weleda S.A.
- PBS (Phosphate Buffer Saline) – Sigma Co.
- Poli L – lisina – Sigma Co.
- Resina sintética entellan – Merck.
- Tripsina – Sigma Co.

LISTA DE ABREVIATURAS

- e - estroma endometrial
- ep - epitélio de revestimento
- eu - epitélio uterino
- ci - câmara de implantação
- DAB - diaminobenzidina
- DG - dia de gestação
- DM - região de células decidualizadas maduras
- DPG - dia de pseudogestação
- EHS - tumor de Engelbreth – Holm –Swarm
- ge - glândulas endometriais
- HE - hematoxilina-eosina
- lu - lúmen
- m = M - miométrio
- MEC - matriz extracelular
- me - mesométrio
- n - núcleo
- ND - região de células não-decidualizadas
- PBS - Phosphate Buffer Saline
- PD - região de células pré-decidualizadas
- ram - região antimesometrial
- rm - região mesometrial
- ve - vênula
- vs - vaso sanguíneo

RESUMO

A reação decidual - ou decidualização - nos camundongos é caracterizada pela transformação de uma população especial de fibroblastos endometriais em células que adquirem características epitelióides, denominadas 'células deciduais' (Finn, 1977). A estrutura resultante desta transformação é denominada Decídua. A reação decidual pode ser desencadeada artificialmente através de estímulos diversos como, por exemplo, através da injeção intrauterina de óleo de amêndoa.

Concomitantemente com a transformação celular, a reação decidual é acompanhada por uma marcante remodelação dos componentes da matriz extracelular (MEC).

As características singulares da decídua nos levaram a realizar um estudo referente à distribuição das glicoproteínas estruturais da MEC, laminina e fibronectina, no fenômeno de decidualização durante a gestação e pseudogestação em camundongos.

Cortes histológicos de úteros de animais não-grávidos, ou nulíparos, e de animais nos dias 5 e 7 da gestação e pseudogestação foram processados e submetidos à imunocitoquímica indireta com método de revelação pela peroxidase. Foram escolhidos para a análise os dias 5 e 7 da gestação e pseudogestação porque: a) o dia 5 corresponde ao início da gestação; b) o dia 7 corresponde período onde a decidualização atinge o máximo de desenvolvimento.

No útero não-grávido, a presença de laminina no estroma é escassa. Nos dias 5 e 7 de gestação e pseudogestação observou-se um evidente aumento na concentração de laminina especialmente na região de células pré-decidualizadas. Sendo a região pré-decidual aquela que corresponde à região de células que estão em transformação decidual, a produção aumentada da glicoproteína reflete a necessidade da mesma para que as células atinjam sua maturidade, ou seja, se transformem em células deciduais maduras e permaneçam unidas entre si. Acreditamos também que, durante a decidualização, a laminina possa desempenhar importantes funções nos processos de adesão e invasão do trofoblasto, além de atuar no processo de transformação decidual.

A distribuição de fibronectina é semelhante àquela observada para a laminina, ou seja, maior positividade nas regiões pré-decidual e não-decidualizada. Entretanto no endométrio não-grávido, a resposta imunocitoquímica é oposta à da laminina. Com base nestes resultados podemos sugerir que ambas as moléculas devam desempenhar papéis semelhantes, tanto durante a transformação decidual, como também fornecendo suporte à invasão das células trofoblásticas.

ABSTRACT

The decidual reaction - or decidualization - in mice is characterized by the transformation of a special population of endometrial fibroblasts in cells that acquire epithelioid characteristics and thus are named 'decidual cells' (Finn, 1977). The structure that results from this transformation is called Decidua. The decidual reaction can be triggered artificially by various stimuli, for instance, by an intrauterine injection of almond oil.

Accompanying the cellular transformation, the decidual reaction is followed by a remarkable remodeling of extracellular matrix components (ECM).

The unique characteristics of the decidua led us to carry out a study focusing on the distribution of the structural glycoproteins of the ECM, laminin and fibronectin, in the decidualization phenomenon during pregnancy and pseudopregnancy in mice.

Histological sections of uteri of non-pregnant or nulliparous animals on days 5 and 7 of pregnancy and pseudopregnancy were processed and submitted to indirect immunocytochemical with a developing method using peroxidase. Days 5 and 7 of pregnancy and pseudopregnancy were chosen for analysis because: a) day 5 corresponds to the beginning of the pregnancy; b) day 7 corresponds to moment when decidualization reaches the maximum development.

The presence of laminin in the stroma is rare in the non-pregnant uterus. On days 5 and 7 of pregnancy and pseudopregnancy a clear increase in the concentration of laminin was detected specially in the region of pre-decidualized cells. As the pre-decidual region is that which corresponds to the region of the cells undergoing decidual transformation, the increased production of glycoprotein reveals that they are necessary in order that the cells reach maturity, that is, to transform themselves in mature decidual cells and to remain united among themselves. We also believe that, during decidualization, the laminin may play important roles in the processes of adhesion and invasion of the trophoblast, apart from acting in the process of decidual transformation.

The distribution of fibronectin is similar to the one detected for the laminin, that is, higher positivity in the pre-decidual and non-decidualized regions. However, in the non-pregnant endometrium, the immunocytochemical response is opposite to the one to the laminin. Based on these results, we can suggest that both molecules might play similar roles not only during the decidual transformation but also giving support to the invasion of trophoblastic cells.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 BIOLOGIA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA

A implantação bem sucedida do blastocisto requer a interação deste com o útero sensibilizado por uma seqüência adequada de hormônios. A implantação somente irá ocorrer com sucesso se o endométrio atingir um grau de receptividade ideal, o que é obtido por ação de níveis precisos de hormônios sexuais, que devem atuar em uma seqüência adequada de estrógeno-progesterona-estrógeno (Finn, 1977).

A implantação do concepto em desenvolvimento no útero materno é um processo altamente complexo que requer uma regulação precisa útero-placenta. Apesar de vários estudos já terem sido publicados, a compreensão de todos os fatores envolvidos nesse processo ainda é insuficiente.

O processo de implantação promove profundas modificações no endométrio de várias espécies de mamíferos, incluindo o rato e o camundongo (Finn, 1977; 1980). O primeiro contato do blastocisto com o organismo materno ocorre através da interação das células trofoblásticas com o epitélio uterino. Este contato inicial desencadeia uma série de modificações no estroma conjuntivo subjacente. O conjunto destas modificações denomina-se 'decidualização'. O contato entre o embrião e a superfície do epitélio uterino se deve à combinação de dois fatores: 1) intumescência do blastocisto; 2) fechamento do lúmen uterino. Acredita-se que ambos os fatores sejam conseqüência da ação da progesterona (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

A primeira descrição morfológica da decídua foi realizada em ratas por

Krehbiel (1937). Após esse trabalho, muitos outros estudos foram realizados abordando diversos aspectos morfológicos e ultra-estruturais da decídua em ratas (Enders e Schlofke, 1967; Welsh e Enders, 1985). Abrahamsohn (1983) foi o primeiro autor a descrever, a nível ultra-estrutural, a morfologia da decídua desenvolvida em camundongos, com enfoque na decídua antimesometrial.

Para que a implantação ocorra com sucesso, o embrião deve alcançar um nível apropriado de desenvolvimento, enquanto que o endométrio deve exibir um estado ideal de receptividade para esse embrião. Esse estado recíproco de receptividade constitui um período crítico da implantação, conhecido como 'janela de implantação' (Abrahamsohn e Zorn, 1993). A receptividade endometrial resulta de uma exposição adequada das células uterinas aos hormônios ovarianos estrógeno e progesterona. A ausência do sincronismo entre o desenvolvimento do embrião e o desenvolvimento endometrial pode resultar em uma falha na implantação (Lea, 1991).

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 DG (Martin, 1968; Finn, 1963). Além desse 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 são os únicos que podem sofrer transformação decidual (Loke, 1995).

No início da gestação em camundongos, os fibroblastos endometriais apresentam-se como células fusiformes, com longos prolongamentos, núcleo grande e ovóide com cromatina frouxa. O contato do blastocisto com o epitélio uterino cons-

titui-se no estímulo que promove a transformação dos fibroblastos endometriais em células decíduais. Tais células apresentam características epitelióides: são volumosas, poliédricas, polinucleadas, poliplóides e com nucléolos bem visíveis (De Feo, 1967; Finn, 1971).

Em camundongos, a partir do quinto DG - 5º DG -, é possível identificar, na porção antimesometrial do útero, três regiões caracterizadas por células em diferentes estágios de transformação decidual. A primeira camada de células plenamente decidualizadas é encontrada imediatamente ao redor da cripta ou câmara uterina que aloja o blastocisto (Abrahamsohn, 1983). Estas células são volumosas, com arranjo compacto, e muitas delas são polinucleadas. Constituem a região de células decíduais maduras (DM).

Segue-se, perifericamente à DM, uma segunda região, constituída por células com características intermediárias entre os fibroblastos endometriais e as células decíduais maduras, denominada 'região de células pré-decíduais' (PD). Ao microscópio eletrônico, as células pré-decíduais apresentam um certo aumento de volume e longos prolongamentos que se contatam com outras células pré-decíduais vizinhas. À medida que se diferenciam, as células decíduais mostram acentuado aumento na quantidade de organelas envolvidas com a síntese de macromoléculas (Abrahamsohn, 1983). Os limites entre ambas as regiões - DM e PD - são pouco definidos (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

Finalmente, nas imediações do miométrio, localiza-se a região de células não-decidualizadas (ND), constituída por fibroblastos endometriais que não decidualizam durante todo o período gestacional.

Uma característica importante do processo de decidualização é o desenvolvimento de filamentos intermediários de desmina (O'Shea et al., 1983; Glasser e Julian, 1986; Glasser et al., 1987; Kisalus et al., 1987; 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 e Julian, 1986).

1.1.1 Indução da Pseudogestação

Na gestação normal, o blastocisto atua como estímulo desencadeador da reação decidual. Em roedores hormonalmente sensibilizados, a decidualização pode ser induzida através de vários estímulos exógenos. A estrutura resultante desse estímulo é muito semelhante à decídua e denomina-se 'deciduoma' (Loeb, 1908, Andrade, 1993; Monice, 1998).

O primeiro passo para a obtenção do deciduoma é induzir a fêmea a um estado de pseudogestação. Nesse caso, diversos métodos podem ser utilizados. Em ratas, a pseudogravidez pode ser induzida por estimulação mecânica ou por choque elétrico aplicados à cervix uterina (De Feo, 1967; Gorospe e Freeman, 1981). Em camundongos e em hamsters, o método mais seguro para obtenção da pseudogravidez é o acasalamento de fêmeas férteis com machos vasectomizados (De Feo, 1967).

Uma vez em estado de pseudogestação, a decidualização pode ser induzida artificialmente através de estímulos diversos, tais como a administração ou injeção intra-uterina de polissacarídeos, óleo, solução salina e até mesmo estímulo mecânico (Finn, 1977; Andrade, 1993, Andrade et al., 1996).

Andrade (1993) realizou amplo estudo sobre a morfologia, ao nível de microscopia eletrônica de transmissão, do deciduoma de camundongos, do quinto ao sétimo dia da pseudogestação (DPG). Esse autor observou serem as células deciduais muito semelhantes àquelas descritas na decídua. Algumas diferenças foram apontadas, entre elas um desenvolvimento mais exuberante do deciduoma, evidenciado pela expressão precoce de algumas características morfológicas típicas da

decidualização.

Andrade (1993) sugere que o blastocisto, embora não seja imprescindível no desencadeamento da reação decidual, parece ser importante no controle do desenvolvimento desse processo. Em outro estudo mais recente, Andrade et al. (1996) mostraram que as células epiteliais do revestimento luminal do útero de camundongos, no período compreendido entre o 6º e 7º DPG, apresentam um comportamento peculiar quando comparadas aos mesmos dias de gestação normal. Embora ocorra perda do epitélio uterino por ocasião do 5º DPG, esse epitélio é restaurado nos dias seguintes, sendo observado como uma delgada camada de células achatadas recobrimo a maior parte da cripta uterina. Esses autores sugerem que esse epitélio se renova a partir da proliferação e migração de células do epitélio luminal da região mesometrial da cripta uterina. Sugerem ainda que componentes da lâmina basal (laminina, colágeno tipo IV, perlecan e entactina) devem orientar a migração celular durante a regeneração.

1.2 MATRIZ EXTRACELULAR

Os tecidos são constituídos não somente por células. Uma parte substancial de seu volume, que correspondente ao espaço extracelular, encontra-se preenchido por uma rede intrincada de macromoléculas secretadas pelas próprias células do tecido, constituindo a matriz extracelular (MEC). Na maioria dos tecidos conjuntivos, as macromoléculas da MEC são secretadas por células da família dos fibroblastos. As duas classes principais de macromoléculas que formam a MEC são: 1) as glicoproteínas estruturais, compreendendo os diferentes tipos de colágeno e o sistema de fibras elásticas, constituindo a MEC fibrilar; 2) as cadeias de heteropolissacarídeos da classe das glicosaminoglicanas (GAGs), sendo que as sulfatadas estão ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanas e as glicoproteí-

nas adesivas, tais como fibronectina, laminina, entactina, vitronectina, trombospondina, entre outras, constituindo a MEC fundamental, antigamente denominada 'substância fundamental amorfa' (Hay, 1991; Alberts et al., 1997).

Dentre as glicoproteínas adesivas, a laminina possui a função principal de adesão de células epiteliais à lâmina basal, enquanto que a fibronectina apresenta basicamente a função de promover a adesão de células não-epiteliais à MEC e permitir o deslocamento ou movimento celular pela matriz (Alberts, 1997).

1.2.1 Laminina

A laminina é uma das primeiras proteínas da matriz extracelular sintetizadas pelo embrião. Nos estágios iniciais do desenvolvimento, a lâmina basal constitui-se principalmente de uma rede de laminina. Esta glicoproteína é formada por um complexo grande e flexível, constituído por três cadeias polipeptídicas muito longas, organizadas na forma de uma cruz assimétrica. Como muitas outras proteínas de matriz extracelular, contém vários domínios funcionais que, nas lâminas basais, interagem com as moléculas de colágeno tipo IV, com o perlecan - proteoglicana heparan-sulfato - e com a entactina. Outros domínios ligam-se a receptores protéicos para laminina localizados na superfície das células, as integrinas. Da mesma forma que o colágeno tipo IV, as moléculas de laminina podem formar auto-agregados *in vitro*, constituindo uma estrutura com aspecto de feltro. Esta rede se organiza principalmente através de interações entre as extremidades dos braços - cadeias polipeptídicas - da laminina. (Thomas, 1993; Bieglmayer, 1986).

A laminina foi isolada pela primeira vez da lâmina basal de células tumorais EHS - tumor Engelbreth-Holm-Swarm - de camundongos. Estudos de células em cultivo têm permitido estabelecer muitas atividades biológicas da laminina como, por exemplo, proliferação, diferenciação, migração e, em algumas células, atividade

regulatória da expressão gênica (Shim, 1997). A laminina também atua como uma proteína de adesão de lâmina basal, interagindo com superfícies celulares, colágeno tipo IV, heparina e perlecan. Vários estudos têm demonstrado a presença de laminina no estroma uterino, demonstrando que esta glicoproteína está associada com os processos de diferenciação celular (Iwahashi, 1996; Guillomot, 1999; Korhonen, 1997).

1.2.2 Fibronectina

A matriz extracelular contém várias proteínas adesivas, cada uma com sítios específicos para outras macromoléculas da matriz, bem como sítios para receptores na superfície das células. Estas proteínas contribuem tanto na organização da matriz como na ligação das células a ela. A primeira proteína, com essas propriedades, a ser caracterizada foi a fibronectina, uma glicoproteína encontrada em todos os vertebrados.

A fibronectina é um dímero composto de duas grandes subunidades unidas por um par de pontes de dissulfeto próximos às suas extremidades C-terminais. Cada subunidade apresenta uma série de domínios funcionalmente diferentes. Cada domínio consiste de módulos menores, cada um repetido em série e normalmente codificado por diferentes exons. Um procedimento clássico para estudar a fibronectina consiste em clivá-la por ação enzimática em vários domínios e determinar a função de cada domínio separadamente. A proteína é tratada com baixas concentrações de enzimas proteolíticas que clivam a cadeia polipeptídica nas regiões de conexão entre os domínios em forma de bastões deixando os domínios intactos, de modo que suas atividades de ligação possam ser testadas. Desta forma, foi demonstrado que um dos domínios liga-se ao colágeno, outro à heparina, enquanto outro interage com receptores específicos na superfície de vários tipos celulares - as

integrinas- (Alberts, 1997).

Existem várias formas - isoformas - de fibronectina, incluindo uma denominada fibronectina plasmática, que é solúvel e circula no sangue e outros líquidos corporais. A fibronectina plasmática participa da coagulação sangüínea e cicatrização de lesões. Todas as outras isoformas se distribuem preferencialmente na superfície celular e são encontradas na matriz extracelular como filamentos altamente insolúveis. Em ambos os casos, os dímeros de fibronectina são intercruzados uns aos outros por pontes de dissulfeto adicionais. Isoformas de fibronectina produzidas no embrião e em cicatrização de lesões são formas apropriadas especialmente para promover a migração e proliferação celulares, necessárias ao tecido em desenvolvimento e sob reparo (Hynes, 1986).

Todas as isoformas de fibronectina são codificadas por um único gene, sendo esse formado por cerca de 50 quilobases e 50 exons de tamanhos semelhantes. Na transcrição desse gene, forma-se uma grande molécula de RNA, que é submetida a um mecanismo de processamento denominado *splicing* alternativo. O processamento se dá em três regiões diferentes, dependendo do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento celular. Em humanos, o processamento origina cerca de 20 RNA mensageiros diferentes, cada um codificando subunidades diferentes de fibronectina. O *splicing* alternativo provavelmente permite que a célula produza o tipo de fibronectina mais adequado para as necessidades do tecido (Alberts, 1997).

A fibronectina, além de ser importante para a adesão das células à matriz, também participa da migração celular em embriões de vertebrados. Grandes quantidades de fibronectina são encontradas, por exemplo, ao longo da via de migração de células do mesoderma durante a gastrulação de anfíbios. A migração destas células pode ser inibida injetando-se vários ligantes como, por exemplo, anticorpos contra fibronectina, que interferem na capacidade das células ligarem-se à fibronectina.

tina. Isto indica que a fibronectina provavelmente promove a migração celular auxiliando as células a fixarem-se à matriz. Acredita-se que o efeito deve ser delicadamente equilibrado de modo que as células migrantes possam aderir à matriz sem ficarem imobilizadas (Alberts, 1997).

Rider et al.(1992) e Babiaz et al.(1996) relatam em seus estudos que diferentes isoformas de fibronectina poderiam participar da decidualização do endométrio de ratas.

1.3 MATRIZ EXTRACELULAR DO ENDOMÉTRIO

Os primeiros estudos referentes à matriz extracelular do endométrio tiveram sua atenção voltada para o conteúdo de colágeno. Harkness e Harkness (1954, 1956) e Montfort e Perez-Tamayo (1961) demonstraram por métodos bioquímicos que a quantidade de colágeno no útero total - endométrio e miométrio - de ratas, aumenta progressivamente durante a gestação. Fainstat (1963) e Lobel et al. (1965, 1967) observaram que, nas áreas em decidualização, há substituição de feixes de fibrilas de colágeno por fibras reticulares, que formam uma delicada malha reticular entre as células deciduais.

Iwahashi et al. (1996) demonstraram, através de estudos imunocitoquímicos, que colágenos do tipo I, III e VI estavam difusamente distribuídos no estroma do endométrio durante o ciclo menstrual humano. O colágeno tipo IV e laminina foram localizados exclusivamente na lâmina basal das glândulas endometriais e nas paredes dos vasos sangüíneos durante as fases proliferativa e secretória do ciclo. Entretanto, no endométrio decidualizado, colágeno tipo IV e laminina foram identificados apenas na região pericelular do estroma endometrial.

Durante a gestação de camundongos, há modificações no arranjo e distribuição dos componentes fibrilares da matriz, com considerável diminuição de fibrilas

de colágeno, principalmente no estroma subepitelial durante o 4º DG. O componente fibrilar reaparece nos 5º, 6º e 7º dias de gestação como fibras reticulares (Martello e Abrahamsohn, 1983). A diminuição da quantidade de fibrilas de colágeno poderia facilitar a transformação das células estromais em células decíduais (Fainstat, 1963). Zorn et al. (1986) observaram ao microscópio eletrônico que, no 2º DG de camundongos, os fibroblastos endometriais apresentam vacúolos citoplasmáticos contendo fibrilas de colágeno. Posteriormente, esses autores detectaram vacúolos semelhantes no citoplasma de células decíduais no 7º DG. Nesses vacúolos foi detectada atividade de fosfatase ácida indicando que, após a fagocitose, ocorre digestão intracelular destas fibrilas (Zorn et al., 1989). Esses dados constituíram a primeira forte indicação da ocorrência de uma remodelação de componentes da matriz extracelular da decídua.

Além do interesse para a reprodução animal, a decídua é um modelo muito interessante do ponto de vista da biologia celular (Abrahamsonhn, 1989; Abrahamsohn e Zorn, 1993). Sabe-se que as células decíduais de camundongo continuam a sintetizar e secretar colágeno como o faziam antes de se transformarem (Oliveira et al., 1991). Além da síntese, há também fagocitose de colágeno resultando em uma remodelação do endométrio necessária para abrigar o embrião (Bijovsky et al., 1992; Zorn et al., 1989; Zorn et al., 1990). Há modificações da matriz extracelular do endométrio representadas por um grande espessamento de fibrilas colágenas (Zorn et al., 1986; Alberto-Rincon et al., 1989). Em um estudo recente, Soares Greca et al. (2000) detectaram, após emprego de coloração citoquímica com azul cuprolínico e tratamento enzimático com glicosidases, a presença de proteoglicanas ricas em dermatan-sulfato associadas com as fibrilas de colágeno espessas que ocorrem na decídua de camundongo.

Vários autores relataram a presença de um material amorfo de aspecto floculento e densidade homogênea entre as células decíduais associado às fibrilas de colágeno (Jollie e Bencosme, 1965; Enders e Schlafke, 1967; Brokelman e Biggers, 1979). Carson et al. (1987); Zorn et al. (1995) mostraram, em experimentos *in-vivo* e *in-vitro*, através da incorporação de glicosamina triciada, que ocorre um acentuado aumento da síntese de ácido hialurônico no dia da implantação do blastocisto, ocorrendo um pico no 4º DG, na linhagem de camundongos por eles estudada. Dutt et al. (1986) sugeriram que a síntese de hialuronatos acompanha a resposta decidual facilitando a invasão do trofoblasto. Segundo os autores, o ácido hialurônico não foi detectado no endométrio virgem. Porém, observou-se grande quantidade dessa glicosaminoglicana nos dias 4, 5 e 6 da gestação, diminuindo no 7º DG (Zorn et al., 1995; Greca, 1996). Por outro lado, as demais glicosaminoglicanas permanecem em níveis basais. Greca et al. (1998), através de estudo citoquímico ultraestrutural com a utilização do corante catiônico safranina O, descreveram uma importante variação quanto à distribuição de proteoglicanas durante a decidualização de camundongos. Esses dados indicam que as proteoglicanas estão de alguma maneira envolvidas com o processo de decidualização e implantação do blastocisto.

Sítios contendo heparan-sulfato foram localizados por imunofluorescência na superfície de células decíduais humanas (Kisalus e Kerr, 1988). Ao redor destas células há uma deposição de material amorfo semelhante à lâmina basal. Outros estudos, também com imunofluorescência em células decíduais cultivadas de ratas, revelaram a presença de laminina, colágeno tipo IV e heparan-sulfato na superfície da célula. (Charpin et al., 1985; Wever et al., 1986). Há indicações indiretas de que a célula decidual de alguns roedores esteja envolvida na produção destas moléculas (Wewer et al., 1985; Glasser et al., 1987). Entretanto, não foi descrita estrutura semelhante em camundongos-fêmeas. Nesses animais aparecem placas eletronden-

sas ligadas à superfície das células decíduais no 5º DG e também nas células pré-decíduais. Estas placas de superfície celular apresentam coloração positiva após tratamento com Vermelho de Rutênio e Safranina O (Greca et al., 1998). Há sugestão de que possam representar sítios de heparan-sulfato e que possam estar envolvidas na formação de junções intercelulares (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

Análises radioautográficas de incorporação de sulfato radioativo (S^{35}), mostraram que as células decíduais de fêmeas de camundongos sintetizam e secretam moléculas sulfatadas para o espaço extracelular (Carvalho, 1989). Análises bioquímicas complementares mostraram que há síntese de glicosaminoglicanas sulfatadas pelas células decíduais, tais como dermatan-sulfato, heparan-sulfato e condroitin-sulfato. Contudo observou-se que a proporção relativa destas moléculas não se modifica durante os 5º, 6º e 7º DG. Entretanto, tanto a síntese como a quantidade destas moléculas são maiores no endométrio nulíparo do que no grávido (Zorn et al., 1995).

De acordo com Toole (1981), cada estágio de diferenciação de um tecido pode ser caracterizado pela presença de diferentes proteoglicanas sulfatadas. Segundo relatos feitos por Greca (1996); Zorn et al. (1995) e Greca et al. (1998), é possível que, em cada estágio de transformação das células do estroma endometrial, intervenha um complemento característico de proteoglicanas sulfatadas, bem como de glicoproteínas estruturais da matriz extracelular, que poderiam estar atuando como uma barreira seletiva à passagem de pequenas moléculas na matriz extracelular no controle da adesão entre as células como também na retenção de água.

Com relação às glicoproteínas estruturais, ao nosso conhecimento, são escassas as informações acerca da fibronectina no endométrio. Os poucos trabalhos já publicados referem-se a resultados obtidos exclusivamente em endométrio de ratas. Apesar disto, autores como Glasser et al. (1987) e Barbiaz et al. (1996) procura-

ram determinar a presença e o papel da fibronectina, sugerindo que as modificações na organização desta molécula no endométrio e a remodelação que o endométrio apresenta durante a decidualização, são conseqüência da modulação da expressão gênica para a fibronectina.

Uma vez que a decídua e o deciduoma apresentam regiões constituídas por células em diferentes estágios de transformação, torna-se necessário realizar uma abordagem *in situ* para determinar o padrão de distribuição e localização destas glicoproteínas. Estudos bioquímicos em útero total podem não refletir estas possíveis diferenças regionais. É necessário identificá-las ao longo dos vários estágios desse processo dinâmico, através de metodologias que permitam compreender a distribuição e localização dessas moléculas nos vários estágios da decidualização.

A decidualização providencia um ótimo modelo para o estudo de interações recíprocas entre as células e os componentes da matriz extracelular, uma vez que a decídua apresenta rápida diferenciação e maturação. É importante destacar que este estudo irá aprofundar o conhecimento da matriz extracelular fundamental durante a gestação e a pseudogestação, uma vez que nesta última não há presença do embrião. Pouco se sabe até hoje do papel exato - se é que existe - desempenhado pelo blastocisto no processo de formação da decídua, a não ser a capacidade das células trofoblásticas em fagocitar células deciduais mortas ou fragmentos destas para nutrir o embrioblasto em crescimento.

Além disso, conhecendo a biologia da decídua, é possível admitir que muitos fenômenos que acompanham a decidualização possam estar relacionados com a composição da matriz extracelular fundamental. O conjunto de eventos que ocorrem durante a decidualização faz com que o estudo desta matriz adquira perspectivas ainda mais amplas, uma vez que está estabelecida a participação da matriz extracelular em fenômenos semelhantes em outros modelos biológicos.

1.4 IMUNOCITOQUÍMICA

Há cerca de 50 anos já se utiliza o princípio de que anticorpos podem ser usados como agentes marcadores em estudos de biologia celular e tecidual. As primeiras aplicações foram centradas na detecção de antígenos microbianos presentes em tecidos. Nas técnicas mais recentes, utilizam-se anticorpos policlonais e monoclonais para estudos diversos como, por exemplo, a diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e em análises histopatológicas eletivas.

A imunocitoquímica é, por definição, a identificação ou coloração específica de um determinado constituinte celular ou tecidual *in situ*. Esta coloração se manifesta através da interação específica de uma determinada molécula do tecido, genericamente conhecida como antígeno, com uma gamaglobulina da classe das imunoglobulinas, o anticorpo. A este último pode ser acoplado um cromógeno que se torna visível em microscopia de luz ou eletrônica.

Coons (1941) introduziu a técnica da imunofluorescência, utilizando anticorpos conjugados com corantes fluorescentes, como a rodamina e a fluoresceína. Entretanto, devido a diversas limitações, esta técnica deixou de ser utilizada por cerca de 20 anos. Alguns anos mais tarde, foi introduzido o método imunocitoquímico indireto, muito mais sensível e com maiores vantagens. Nesse procedimento, o antígeno é primeiramente acoplado a um anticorpo específico - rotineiramente denominado de anticorpo primário - e a esse, por sua vez, é acoplado um segundo anticorpo - o anticorpo secundário - conjugado a um cromógeno.

Graças aos avanços nas técnicas bioquímicas de purificação de moléculas biológicas, os anticorpos utilizados para estudos imunocitoquímicos apresentam alta especificidade e também alta afinidade para com o antígeno de interesse, como acontece com os anticorpos monoclonais. Esses dois fatores garantem um baixo nível de reações falso-positivas. A afinidade de um determinado anticorpo é definida

pelo seu poder de ligação ao sítio específico da molécula do antígeno. O título de um anticorpo expressa a concentração de determinada imunoglobulina no soro imunizado, sendo a medida da mais alta diluição que ainda pode ser visível com a precipitação do complexo formado pelo antígeno-anticorpo.

Além desses aspectos, deve-se acrescentar que a utilização de controles nas colorações imunocitoquímicas é essencial para determinar a especificidade da coloração. Um anticorpo, seja ele policlonal ou monoclonal, deve reagir somente com a molécula específica da organela, célula ou tecido desejado. Em geral, faz-se o controle da reação imunocitoquímica indireta incubando-se o mesmo corte do tecido com uma solução ausente do primeiro anticorpo. Com a omissão do anticorpo primário, nenhuma reação deverá ocorrer no tecido. Comparando-se as mesmas áreas do tecido-controle com as do tecido incubado na presença do anticorpo, têm-se a precisa localização da molécula que se deseja encontrar.

Para a evidenciação da reação imunocitoquímica, costuma-se conjugar os anticorpos com substâncias marcadoras, os cromógenos. Como exemplos mais rotineiros, utilizam-se enzimas - peroxidase -, fluorocromos - fluoresceína, rodamina, vermelho Texas e ficoeretrina - e ferritina e ouro coloidal, comumente utilizado para estudos de imunocitoquímica em microscopia eletrônica.

O uso de marcadores enzimáticos veio substituir o componente fluorescente pelo complexo imunoglobulina-peroxidase. A peroxidase é uma enzima que se torna ativada na presença de peróxido de hidrogênio - água oxigenada -, transferindo elétrons para uma substância que se acopla à reação. O resultado da ação da enzima é uma reação citoquímica, cujo produto precipitado insolúvel no sítio de interação antígeno-anticorpo adquire cor. Dentre estas substâncias, podemos citar a diaminobenzidina e a fosfatase alcalina. O cromógeno mais comumente utilizado para o sistema peroxidase é a 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Este composto, na pre-

sença da peroxidase e do peróxido de hidrogênio, forma um precipitado cuja coloração varia do preto ao marrom-claro. O precipitado é insolúvel em álcoois e xileno, o que permite obter lâminas permanentes, o que se constitui numa vantagem com relação ao uso de fluorescentes - que geralmente perdem sua atividade de fluorescência em pouco tempo. A desvantagem da imunoperoxidase é a possibilidade de se evidenciar enzimas endógenas do tecido, que podem mascarar a coloração específica.

Outro fator crucial para a obtenção de bons resultados imunocitoquímicos corresponde ao fixador empregado no processamento do tecido em questão. O fixador ideal deve sempre desempenhar duas funções: 1) preservar a morfologia das estruturas celulares; 2) prevenir a perda ou migração dos antígenos. Infelizmente as soluções fixadoras que promovem ótima preservação morfológica podem, ao mesmo tempo, minimizar as propriedades antigênicas do tecido. Em geral observa-se redução de antigenicidade à medida que se promove aumento de concentração do fixador (Mao, S.Y. et al., 1994).

2 OBJETIVOS

A revisão da literatura apresenta vários estudos acerca da matriz extracelular fibrilar e fundamental do endométrio durante a gestação de roedores, especialmente em ratas. O presente estudo procura elucidar uma relevante questão dentro do amplo contexto que o fenômeno da decidualização apresenta: Como é a distribuição e qual a localização das glicoproteínas estruturais laminina e fibronectina durante a gestação e pseudogestação em camundongos, uma vez que nesta última o blastocisto está ausente? Para responder esta questão, os objetivos propostos para este trabalho foram:

- 1) Obter decídua e deciduoma de camundongos, e adequar a metodologia imunocitoquímica para o estudo da laminina e fibronectina;
- 2) Compreender a distribuição das glicoproteínas laminina e fibronectina em relação aos componentes do endométrio decidualizado, através da imunoperoxidase;
- 3) Comparar os resultados obtidos com aqueles relatados pela literatura pertinente para compreender o papel biológico destas glicoproteínas nos processos de decidualização natural e induzida artificialmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados cinco grupos de animais, cada um formado por 5 camundongos fêmeas (*Mus musculus* var. Suíço-Albino). Todos tinham cerca de três meses de idade e peso médio de 30g. A divisão dos grupos de animais foi realizada da seguinte maneira:

1. Grupo I: formado por animais não-grávidos em estro;
2. Grupo II: formado por animais grávidos no dia 5 da gestação;
3. Grupo III: formado por animais grávidos no dia 7 da gestação;
4. Grupo IV: formado por animais pseudográvidos no dia 5 da pseudogestação;
5. Grupo V: formado por animais pseudográvidos no dia 7 da pseudogestação.

Para a obtenção de fêmeas grávidas, foram utilizados 10 camundongos machos férteis - mantidos em gaiolas separadas - enquanto que, para a obtenção de fêmeas pseudográvidas, utilizamos 10 camundongos machos vasectomizados. Todos os machos tinham em média seis meses de idade. Todos os animais eram provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde recebiam alimento convencional e água *ad libitum*. Além disso, todos os camundongos receberam um suprimento adicional de alimento constituído de milho, girassol e aveia na proporção 3:1:1.

3.2 VASECTOMIA DOS CAMUNDONGOS MACHOS PARA INDUÇÃO DA PSEUDOGESTAÇÃO

Um grupo de 10 camundongos 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 recebiam água, ração convencional e complemento alimentar, por um período de 30 dias. Após esse período, para certificar-se de que o processo cirúrgico tinha sido eficaz - controle da vasectomia -, três camundongos fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos vasectomizados para acasalamento. Uma vez verificada a presença da rolha vaginal – indicativo de que houve acasalamento -, as fêmeas foram mantidas em gaiolas separadas do plantel original pelo período de quinze a vinte-e-um dias, onde era observado se havia indícios de gravidez. Após esse período, os camundongos cuja vasectomia tinha sido eficaz, tornaram-se aptos a integrar o plantel e passaram a ser utilizados na obtenção de fêmeas pseudográvidas.

3.3 ACASALAMENTO PARA OBTENÇÃO DE FÊMEAS GRÁVIDAS E PSEUDOGRÁVIDAS

Uma vez obtido o plantel de machos vasectomizados, camundongos-fêmeas nulíparas foram acondicionadas em gaiolas com machos, na proporção 3:1 durante o período noturno. A mesma proporção de fêmeas nulíparas foi acondicionada nas gaiolas com machos férteis.

Pela manhã, em torno das 08:00h, as fêmeas eram examinadas para verificação da presença da rolha vaginal. Nos camundongos, a rolha vaginal é um indicativo de que houve acasalamento e, portanto, marca o início da gestação ou da pseudogestação. O dia da presença da rolha vaginal foi considerado como o primeiro dia da gestação (DG) ou da pseudogestação (DPG).

3.4 INDUÇÃO DA DECIDUALIZAÇÃO

Na tarde do dia 4 da pseudogestação - por volta das 15:00 h -, as fêmeas pseudográvidas, sob anestesia apropriada, tiveram seus cornos uterinos expostos

através de método cirúrgico (segundo descrições de Finn e Keen, 1963; Andrade, 1993; Monice, 1998). Cada corno uterino recebeu, na altura da junção útero-tubal, a injeção de 30µl de óleo de amêndoa purificado (Laboratório Weleda), como estímulo para a decidualização. Após esse procedimento, os animais eram 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.

3.5 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE DECIDUALIZAÇÃO

As fêmeas pseudográvidas que haviam recebido a injeção intra-uterina de óleo de amêndoa foram sacrificadas nos dias 5 e 7 da pseudogestação. O mesmo aconteceu com as fêmeas grávidas nos mesmos dias de gestação.

Em ambos os casos, os cornos uterinos foram dissecados e processados para metodologia histológica. Para os animais no dia 5 da gestação ou da pseudogestação, utilizamos a técnica preconizada por Psychoyos (1961) e por Finn e McLaren (1967) para permitir a dissecação e o isolamento dos sítios decidualizados. Esta técnica consiste em injetar na veia da cauda do animal 15µl do corante Azul de Evans a 0,1% diluído em solução salina. Após vinte minutos, os animais eram sacrificados por deslocamento cervical e os cornos uterinos cirurgicamente expostos para remoção dos sítios decidualizados.

O corante injetado na corrente sangüínea do animal evidencia os sítios decidualizados que aparecem como faixas azuladas ao longo do útero. Esse processo, conhecido como Reação de Pontamina, evidencia o aumento da permeabilidade vascular nas áreas do endométrio onde está ocorrendo a reação decidual (Abrahamsohn e Zorn, 1993). Os sítios decidualizados das fêmeas pseudográvidas correspondem às regiões do endométrio onde ocorreu decidualização como res-

posta ao estímulo desencadeado pelo óleo injetado. Os sítios de implantação das fêmeas grávidas correspondem aos locais onde houve a implantação dos blastocistos.

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. Durante a fixação, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, os sítios de decidualização foram isolados das regiões onde não houve reação de Pontamina, sendo em seguida seccionados transversalmente com o uso de lâmina de barbear e mantidos no mesmo fixador por um período máximo de três horas à temperatura ambiente.

A partir do dia 6, os sítios de decidualização, já apresentam dimensões que permitem sua observação a olho desarmado, tendo sido, portanto, desnecessária a utilização do Azul de Evans. Desta forma, sítios do dia 7 foram apenas dissecados e seccionados sob microscópio estereoscópico.

Os cornos uterinos das fêmeas em estro foram colhidos, seccionados transversalmente e submetidos ao procedimento histológico.

Toda a utilização dos animais respeitou as normas e códigos de ética vigentes no país, que tratam do manuseio de animais de laboratório, sendo que a quantidade de animais utilizada foi aquela estritamente necessária para a realização deste trabalho, e a metodologia anestésica foi adotada de forma a evitar sofrimento aos animais.

3.6 PROCEDIMENTO PARA FIXAÇÃO E EMBLOCAGEM EM PARAFINA

As secções uterinas foram fixadas na solução fixadora de Metacan conforme o protocolo abaixo:

1. Fixação em solução de metacan (metanol a 60%, clorofórmio a 30% e

- ácido acético glacial a 10%) durante um período máximo de 03 horas em temperatura ambiente;
2. Desidratação: três banhos de 30 minutos cada em etanol absoluto em temperatura ambiente;
 3. Banho *overnight* em mistura de etanol absoluto + xileno (v/v) em temperatura ambiente;
 4. Diafanização: dois banhos de trinta minutos cada em xileno em temperatura ambiente;
 5. Impregnação em parafina líquida a 58°C por 03 horas;
 6. Emblocagem em nova parafina;
 7. Microtomia (cortes de 5µm);
 8. Pescagem de dois a três cortes em lâminas limpas cobertas com solução adesiva de Poli-L-Lisina (Sigma Co.);
 9. Coloração rotineira de uma lâmina de cada sítio de implantação pela hematoxilina e eosina;
 10. Processamento imunocitoquímico.

3.7 PROCEDIMENTOS PARA IMUNOCITOQUÍMICA

Como já nos referimos na Introdução deste trabalho, os métodos imunocitoquímicos utilizam anticorpos específicos para detectar moléculas nos tecidos. No presente estudo foi utilizado o método genericamente denominado 'Imunoperoxidase em Microscopia de Luz'.

Cortes de sítios de decidualização de decíduoma foram inicialmente reidratados, lavados em PBS e incubados na presença da enzima tripsina a 0,01% diluída em PBS. Os cortes de sítios de nulíparos e de implantação de decídua passaram pelo mesmo processo, porém sem incubação com tripsina.

Os cortes foram em seguida incubados em solução de PBS adicionado com peróxido de hidrogênio para inibição da atividade de peroxidases endógenas do tecido. A seguir, foram incubados em meio contendo PBS/BSA a 10% (Bovine serum

albumine, Sigma Co.) para impedir marcação inespecífica. Seguiu-se a incubação com anticorpos policlonais para laminina e fibronectina em diluição determinada para cada anticorpo: 1:400 para laminina e 1:500 para fibronectina. A incubação foi realizada em câmara úmida por um período não superior a 16 horas, à temperatura de 4°C. O anticorpo anti-laminina foi produzido e gentilmente cedido pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, São Paulo, e o anti-fibronectina foi produzido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga (Laboratório de Matriz Extracelular, Departamento de Biologia Celular, UFPR).

Após esse período, os cortes foram novamente lavados em PBS e realizou-se a segunda incubação utilizando-se anticorpo anti-IgG de coelho - diluição 1:1000 em PBS - . A incubação foi realizada num período não superior a 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram submetidos à revelação da peroxidase utilizando-se solução de diaminobenzidina a 0,05% (DAB) em PBS contendo peróxido de hidrogênio, por um período máximo de 10 minutos.

O protocolo geral para a imunoperoxidase foi:

1. Reidratação dos cortes em banhos de gradação decrescente de etanol;
2. Banho em água destilada;
3. Banho em PBS;
4. Digestão em tripsina a 0,01% pH 7,8 por 10 minutos em temperatura ambiente - apenas para os cortes de decíduoma;
 - Solução de tripsina (Sigma Co): 15mg de tripsina, 134mg de cloreto de cálcio em 100ml de PBS 0,01 M, pH 7,4.
5. Lavagem em dois banhos de PBS de 5 minutos cada;
6. Bloqueio da peroxidase endógena em solução contendo 900 µl de peróxido de hidrogênio a 30% em 30 ml de PBS, durante 30 minutos, em temperatura ambiente;
7. Dois banhos de PBS de 5 minutos cada;

8. Bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos em PBS/BSA a 10%, por 30 minutos, temperatura ambiente;
9. Incubação dos cortes com anticorpo primário (anti-laminina na diluição de 1:400 e anti-fibronectina na diluição de 1:500) em PBS/Tween a 0,3% por 16 horas a 4°C.;
10. Dois banhos de PBS de 5 minutos cada;
11. Incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (diluição 1:1000) em PBS por duas horas em temperatura ambiente;
12. Dois banhos de PBS de 5 minutos cada;
13. Revelação da peroxidase em solução contendo 5mg de 3,3-diaminobenzidina (Sigma, Co.) diluída em 10 ml de PBS 0,01M pH 7,4, adicionada com 6µl de peróxido de hidrogênio a 30%, durante 5 minutos, em temperatura ambiente;
14. Três banhos de PBS de 5 minutos cada;
15. Dois banhos de água destilada de 5 minutos cada;
16. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 90 segundos;
17. Banho em água corrente por 10 minutos;
18. Desidratação em gradação crescente de etanol;
19. Montagem em resina sintética entellan (Merck).

Alguns cortes foram incubados na ausência do anticorpo primário e serviram como controle negativo da reação. Cortes de determinados órgãos – rim, pulmão e intestino grosso – e de tumor EHS foram processados conjuntamente e serviram como controle positivo à presença de laminina e fibronectina.

Após a revelação, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em resina sintética entellan (Merck). As análises e os registros fotográficos foram obtidos em filme Kodak ASA-100 com fotomicroscópio Olympus do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, sob coordenação da Prof^a Dr^a Gisele Bordignon.

4 RESULTADOS

4.1 ENDOMÉTRIO NULÍPARO

4.1.1 Morfologia do Endométrio Nulíparo na Fase Estro

Para a análise da estrutura histológica do estroma do útero nulíparo, utilizamos cortes transversais de útero de camundongo fêmea não-grávida na fase estro do ciclo estral.

Nos cortes de útero nulíparo submetidos à coloração pela hematoxilina e eosina pode-se observar um amplo lúmen uterino, característico da fase estro. O endométrio era revestido por um epitélio simples colunar apoiado sobre um estroma de tecido conjuntivo frouxo (Figuras 1A, 1B e 2A). O estroma apresentava grande quantidade de matriz extracelular e células, principalmente fibroblastos endometriais, além de glândulas tubulosas endometriais (Figuras 1B, 1C e 1D). Externamente ao endométrio, encontram-se duas camadas de células musculares lisas que compõem o miométrio (Figuras 1A e 2A). Em visão panorâmica, observa-se a região mesometrial, voltada para o mesométrio e a região antimesometrial, situada no lado oposto ao mesométrio (Figura 1A).

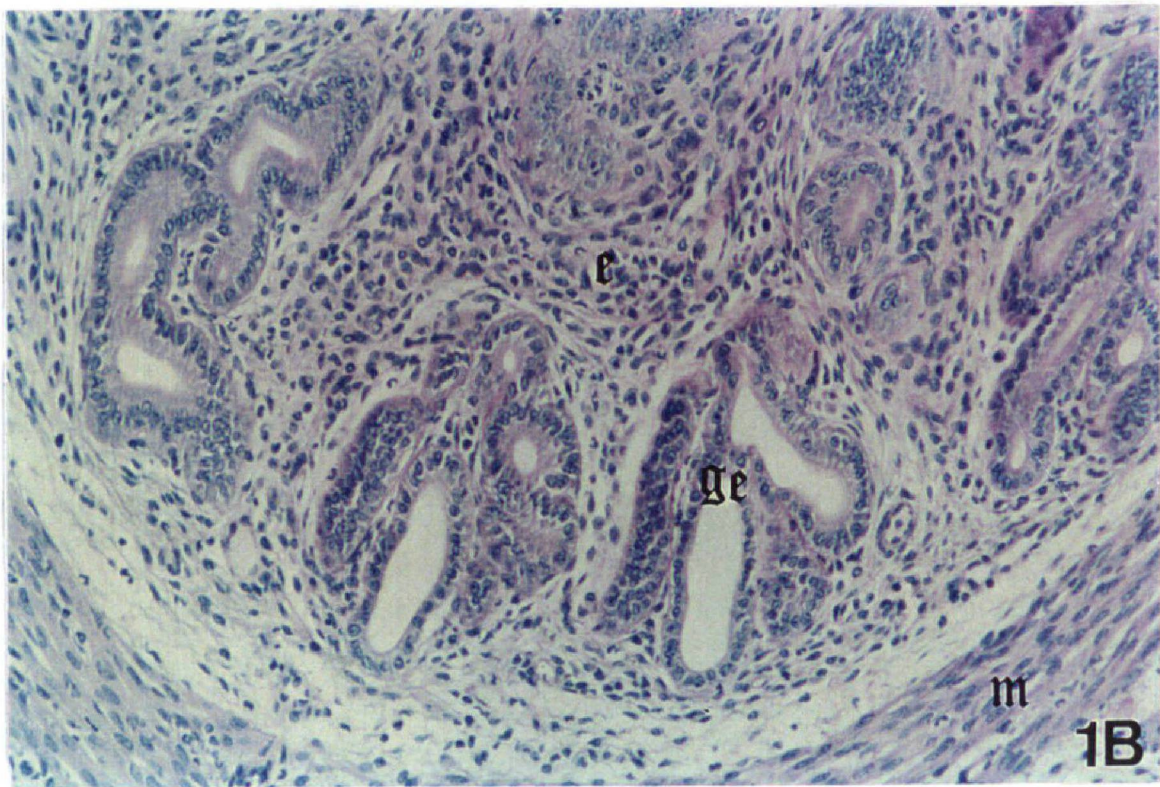
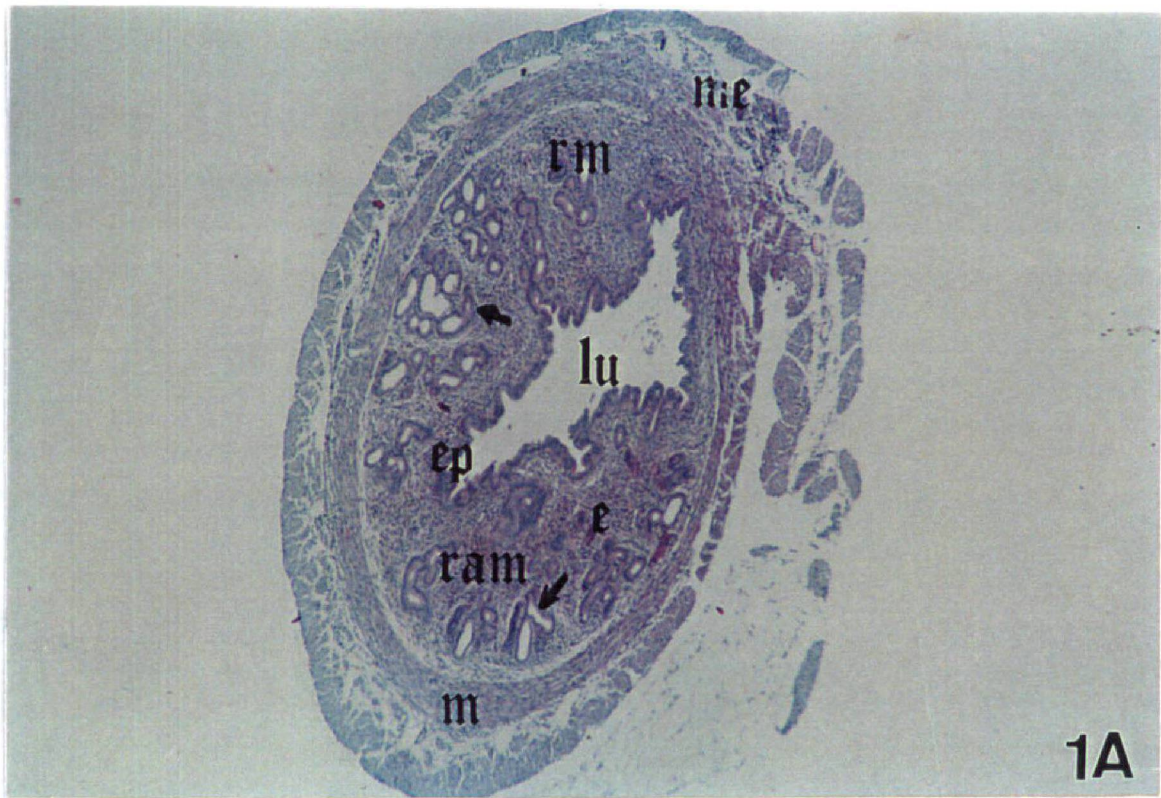
FIGURA 1

ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO NULÍPARO

1A - Visão panorâmica de corte transversal de útero nulíparo. Observar a presença de numerosas glândulas endometriais (setas). Externamente circundando o estroma endometrial (e), observa-se um cinturão de células musculares lisas, constituindo o miométrio (m). Internamente nota-se a presença de um amplo lúmen (lu) delimitado por um epitélio de revestimento (ep). ram= região anti-mesometrial; rm= região mesometrial; me= mesométrio. 55,1x. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

1B - Maior aumento da região antimesometrial do endométrio nulíparo. Observar as glândulas endometriais (ge) com lúmens dilatados, característicos da fase estro do ciclo estral. O estroma endometrial (e) é constituído por tecido conjuntivo frouxo. m= miométrio. 257,8x. HE.

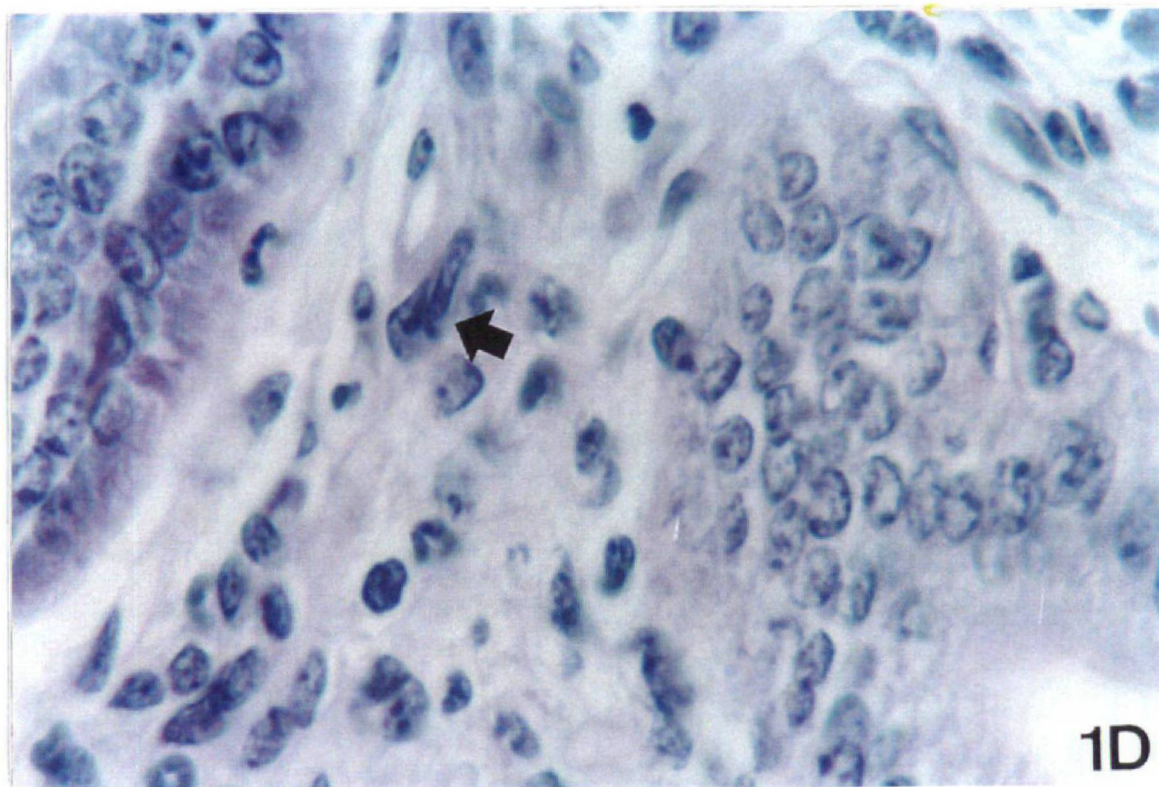
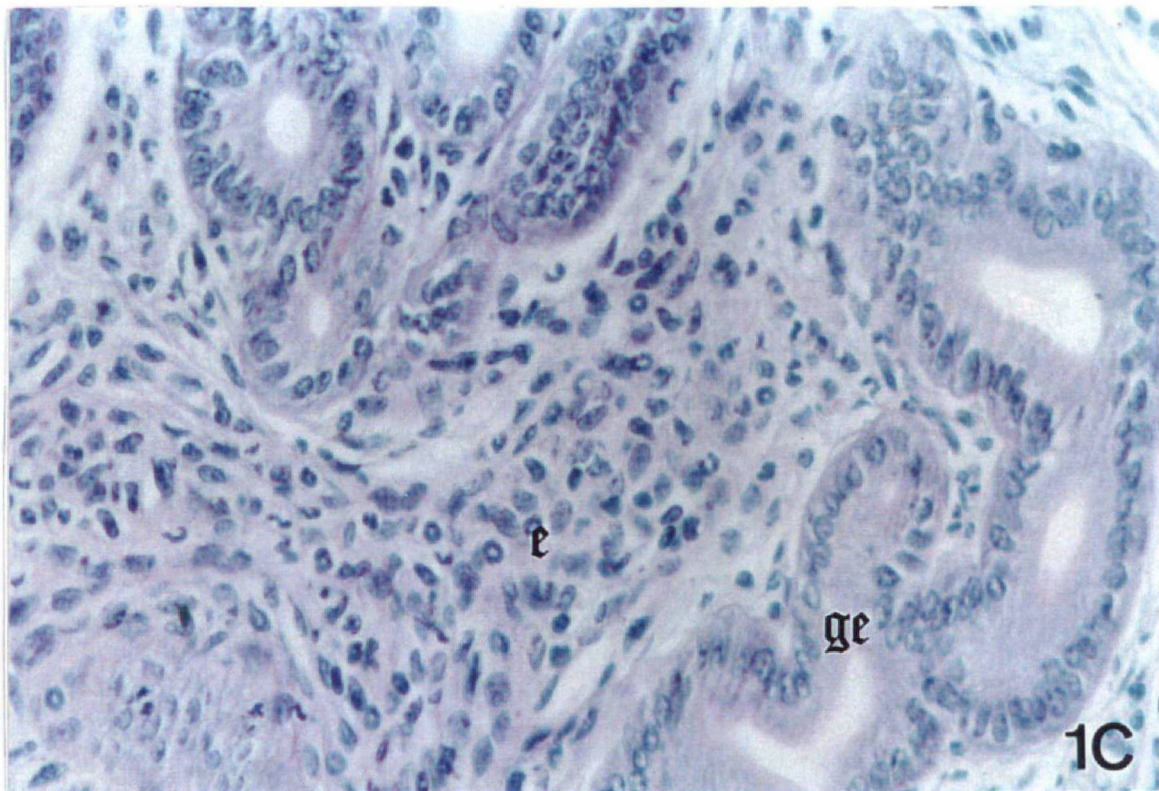
4.1.2 Documentação fotográfica



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 1A e 1B)

1C – Detalhe da região antimesometrial. ge= glândulas endometriais; e= estroma endometrial. 551,7x. HE.

1D – Detalhe do estroma uterino, observar os diversos tipos celulares com predomínio de fibroblastos endometriais (seta). 1379,4x. HE.



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 1C e 1D)

4.1.3 Distribuição de Laminina e Fibronectina no Endométrio Nulíparo

Nos cortes de útero nulíparo incubados na presença do anticorpo policlonal anti-laminina, pode-se observar, no estroma uterino, a ausência desta glicoproteína (Figura 2C e 2C-Encarte).

Entretanto, uma situação totalmente oposta ocorre com os cortes incubados na presença do anticorpo policlonal anti-fibronectina. A forte positividade indica a presença de grande quantidade de fibronectina no endométrio (Figura 2D e 2D-Encarte).

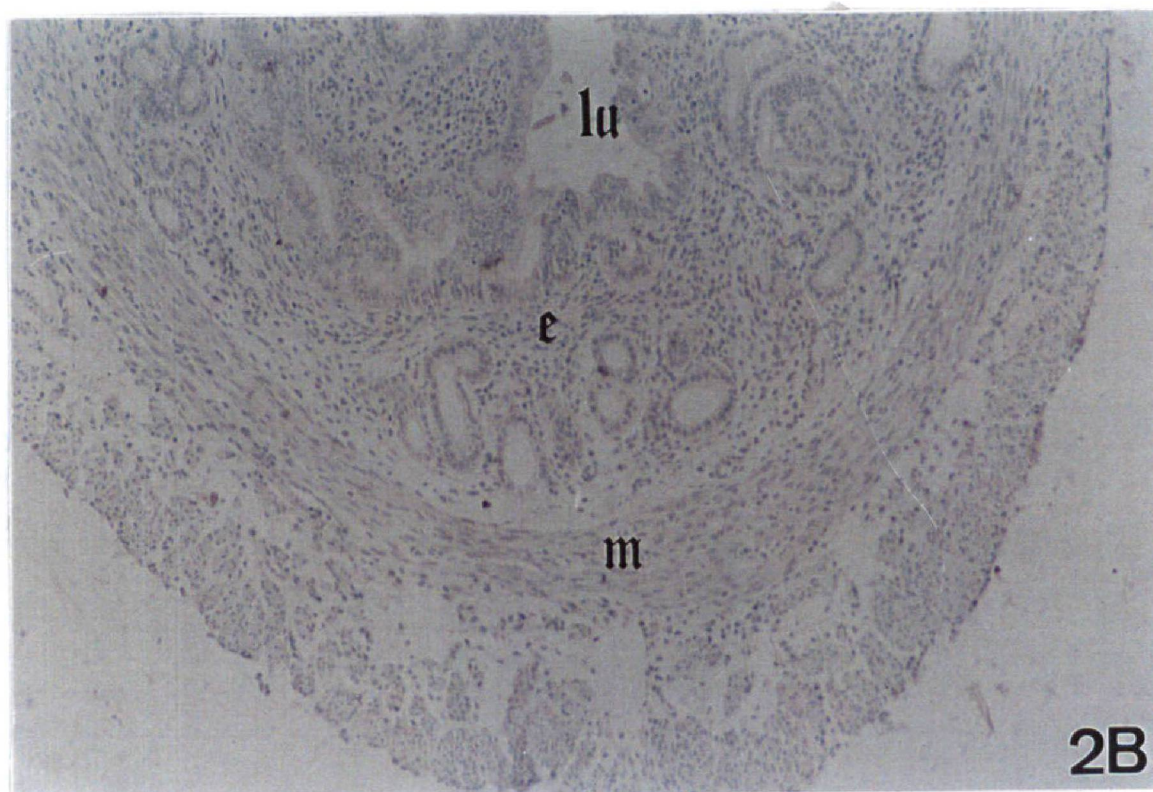
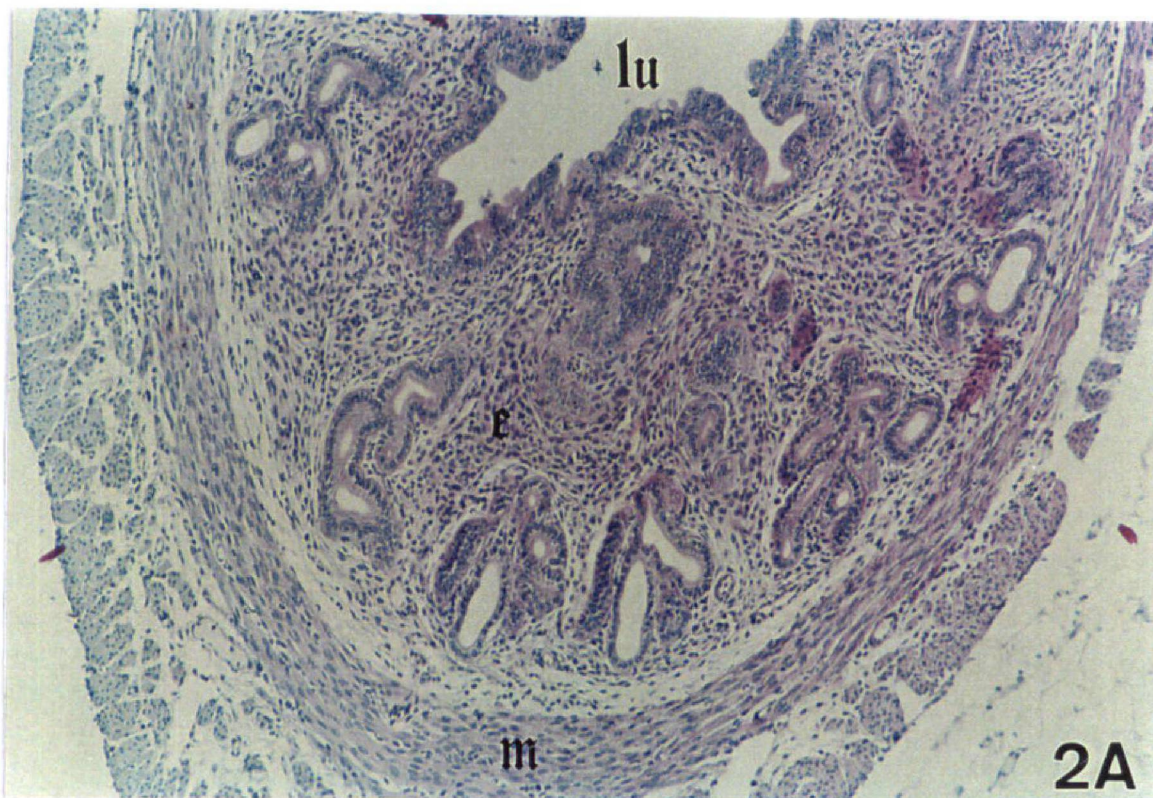
FIGURA 2

DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA E FIBRONECTINA NO ENDOMÉTRIO NULÍPARO

2A - Corte transversal seqüencial da região antimesometrial do útero. e=estroma endometrial; m= miométrio; lu= lúmen. 137,9x. HE.

2B - Controle negativo incubado na ausência do anticorpo primário. A especificidade da reação imunocitoquímica é constatada pela inexistência de positividade inespecífica. e= estroma endometrial; m= miométrio; lu= lúmen. 137,9x. HE.

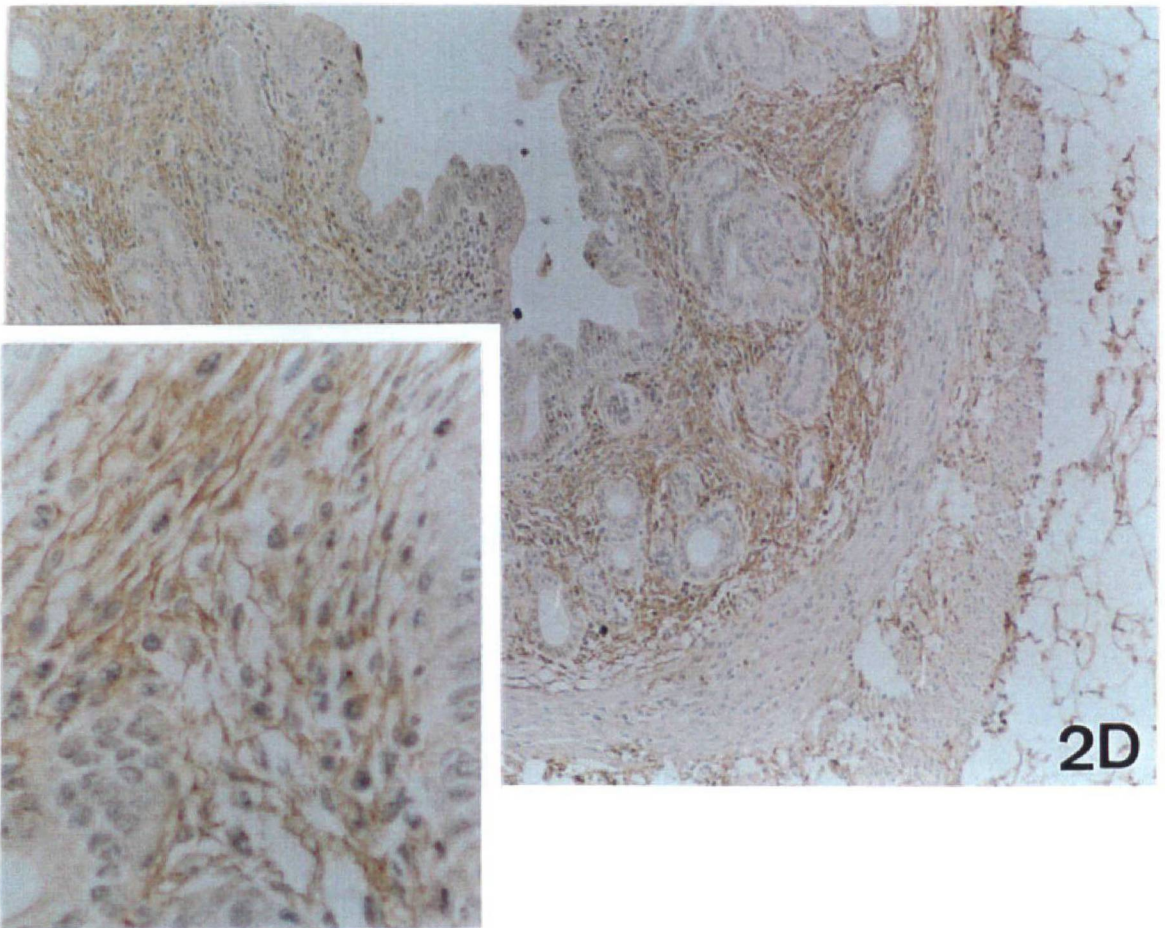
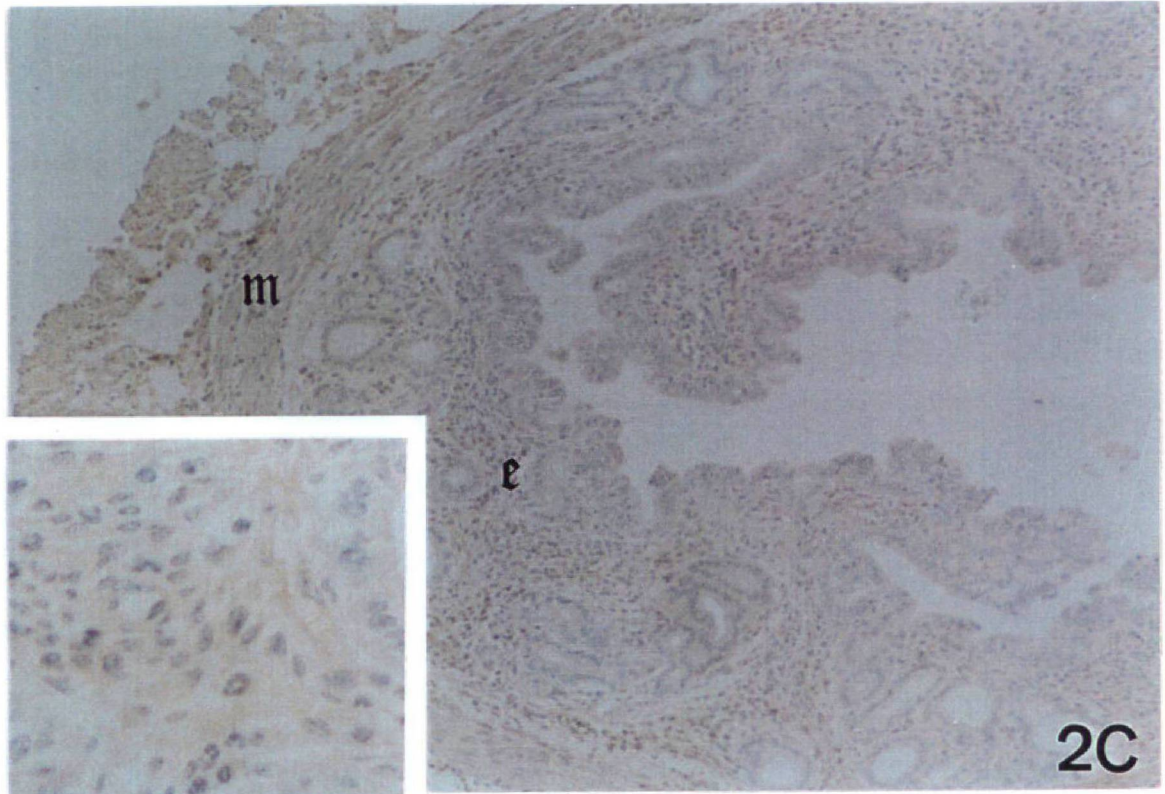
4.1.4 Documentação Fotográfica



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 2A e 2B)

2C - Corte incubado na presença do anticorpo policlonal anti-laminina. Identifica-se a ausência da glicoproteína no estroma endometrial (e) e no miométrio (m). 137,9x.
Encarte: Grande aumento do estroma. 551,7x.

2D - Corte incubado na presença do anticorpo policlonal anti-fibronectina. O endométrio nulíparo apresenta forte positividade para a fibronectina. 137,9x.
Encarte: Detalhe do estroma endometrial mostrando que a fibronectina apresenta uma distribuição homogênea em torno das células. 551,7x.



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 2C e 2D)

4.2 DIA 5 DA GESTAÇÃO E PSEUDOGESTAÇÃO

4.2.1 Morfologia da Decídua e do Deciduoma

Os cortes transversais corados pela hematoxilina e eosina da região anti-mesometrial do útero grávido e pseudográvido no dia 5 apresentaram uma organização histológica muito semelhante, ou seja, na região imediatamente vizinha ao lúmen uterino - próximo à câmara de implantação do blastocisto ou de contato com óleo de amêndoa - identificam-se facilmente as três regiões de células em diferentes estágios de diferenciação: 1) a região de células decíduais maduras; 2) a região de células pré-decíduais; 3) a região de células não-decidualizadas (Figuras 3A e 3B).

A região de células decíduais maduras corresponde à primeira camada de células encontradas subjacente à luz uterina. É constituída de células volumosas, compactadas e mesmo polinucleadas. Os núcleos apresentam vários nucléolos evidentes. Os espaços intercelulares são reduzidos (Figuras 3C, 3C-Encarte, 3-D e 3D-Encarte). Na periferia desta região observa-se a região de células pré-decíduais, cujas células são menores que as maduras. Os espaços intercelulares ainda estão presentes. (Figuras 3E e 3G). Finalmente, nas imediações do miométrio, localiza-se a região de estroma não-decidualizado (Figuras 3F e 3H), constituída por células muito semelhantes aos fibroblastos observados no endométrio nulíparo. Os espaços intercelulares são amplos. Tais células não sofreram transformação decidual.

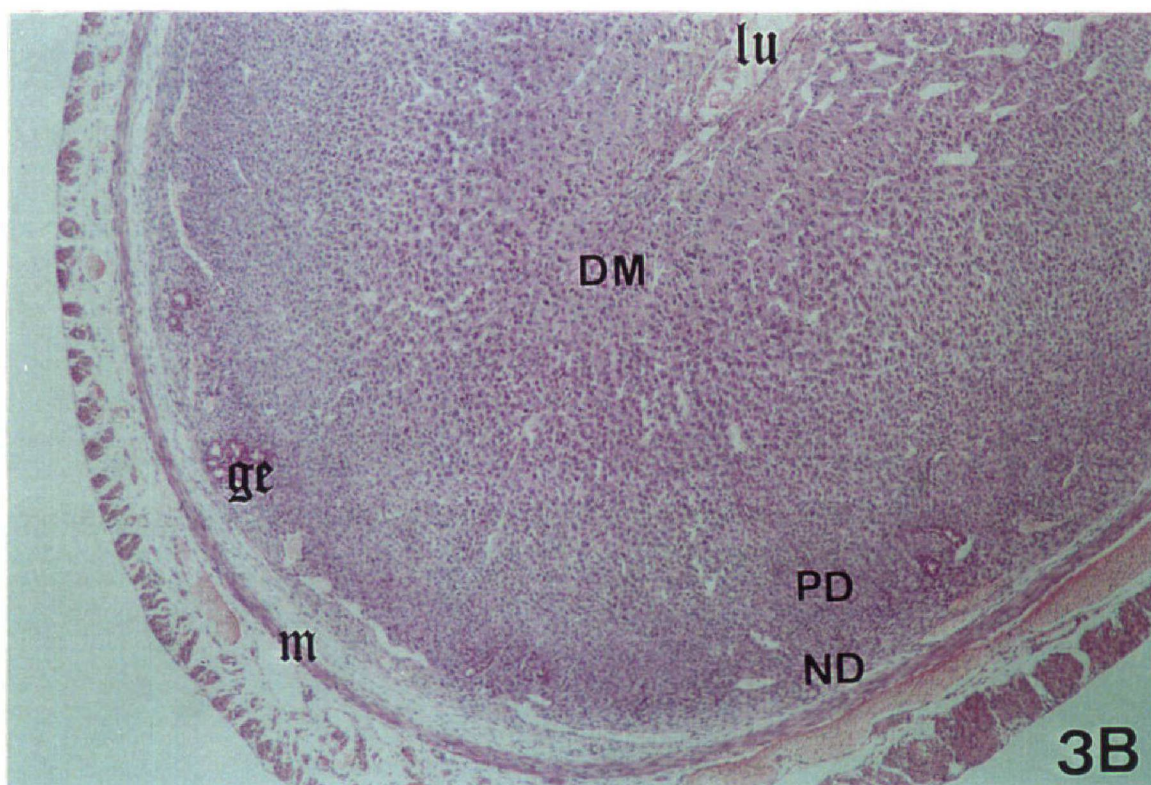
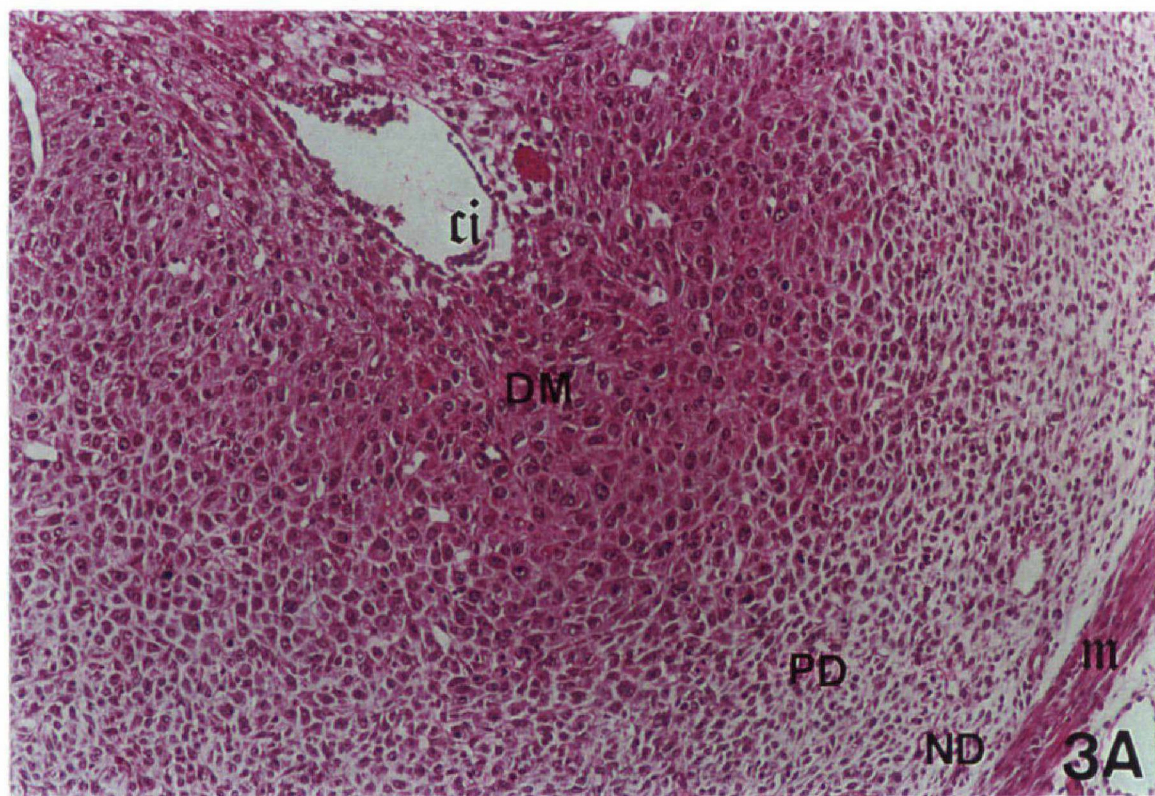
FIGURA 3

ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA NO DIA 5

3A - Decídua no dia 5 da gestação. Na região antimesometrial é possível identificar três regiões de células em diferentes estágios: DM= região de células deciduais maduras; PD= região de células pré-deciduais; ND= região de células não-decidualizadas. ci= câmara de implantação; m= miométrio. 137.9x. HE.

3B - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. Comparando esta figura com a anterior, pode-se constatar uma grande semelhança entre ambas as estruturas. Também é possível identificar as mesmas três regiões celulares: DM; PD e ND. lu= lúmen; ge= glândulas endometriais; m= miométrio. 55,1x. HE.

4.2.2 Documentação Fotográfica



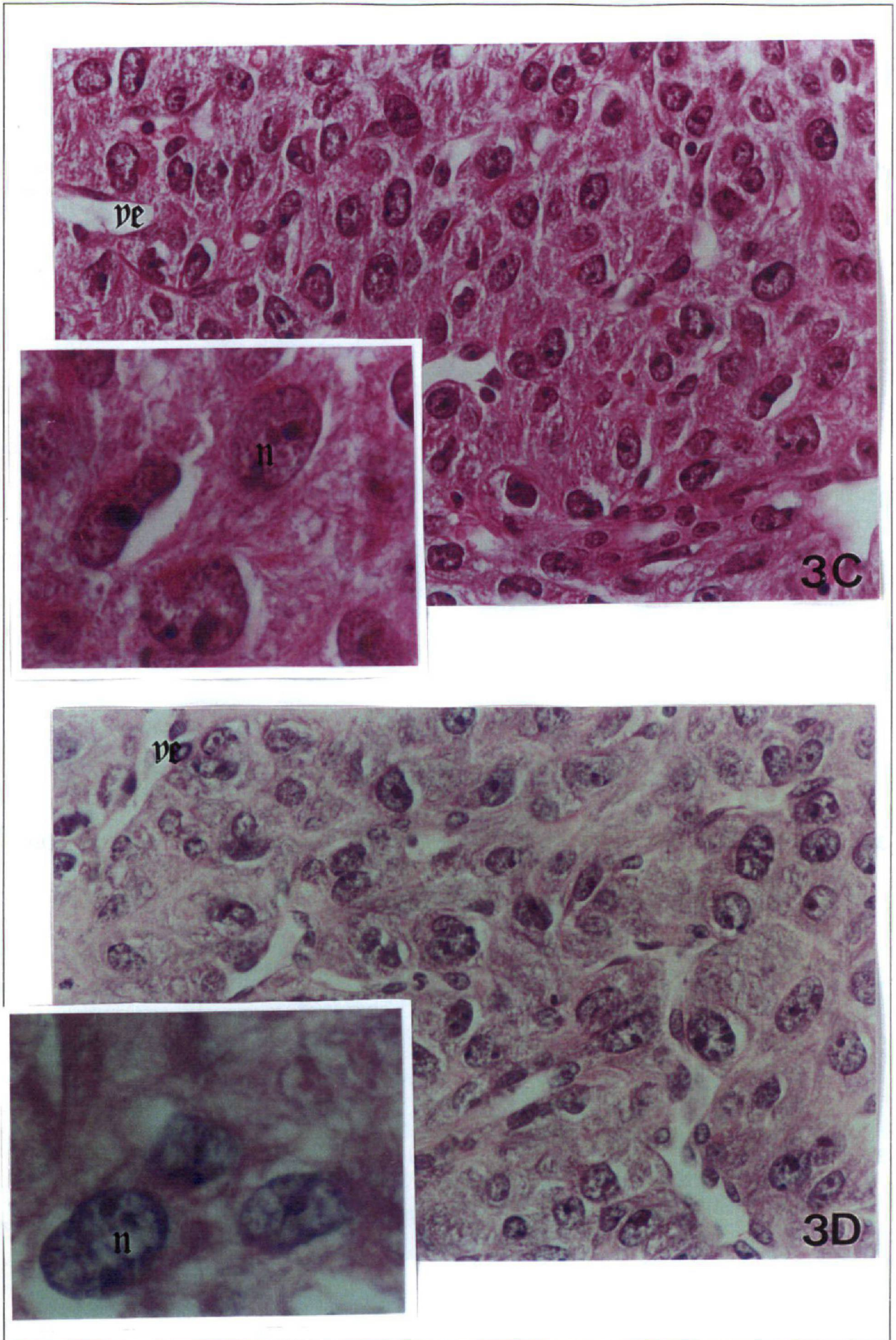
(Verso da página anterior: Legendas das figuras 3A e 3B)

3C - Decídua no dia 5 da gestação. As células decíduais maduras são volumosas, compactadas e os espaços intercelulares são reduzidos. ve= vênulas. 551.7x. HE.

Encarte: Detalhe das células decíduais maduras, onde pode-se observar núcleos (n) eucromáticos com nucléolos evidentes. 1379,4x. HE.

3D – Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. As células decíduais maduras apresentam as mesmas características morfológicas daquelas observadas na decídua. ve= vênulas. 551.7x. HE.

Encarte: Em grande aumento observa-se a mesma situação das células maduras da decídua. n= núcleo.1379,4x. HE.



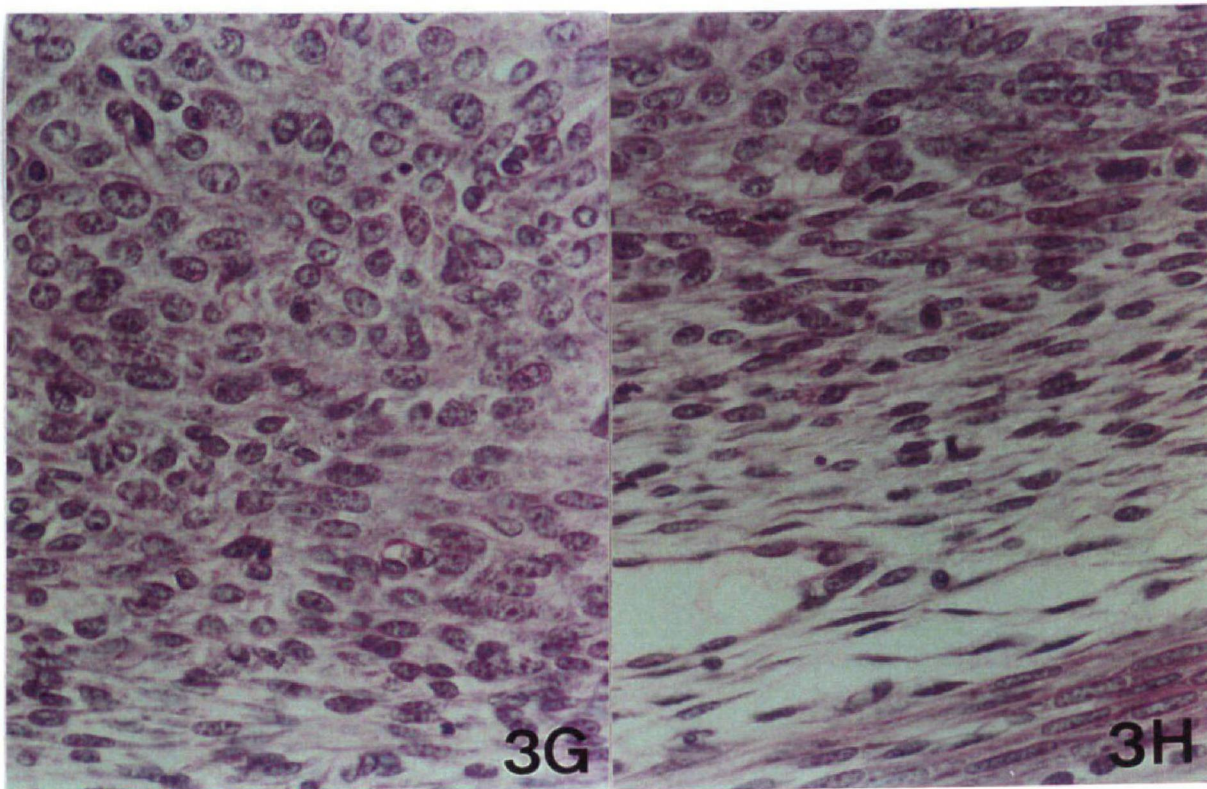
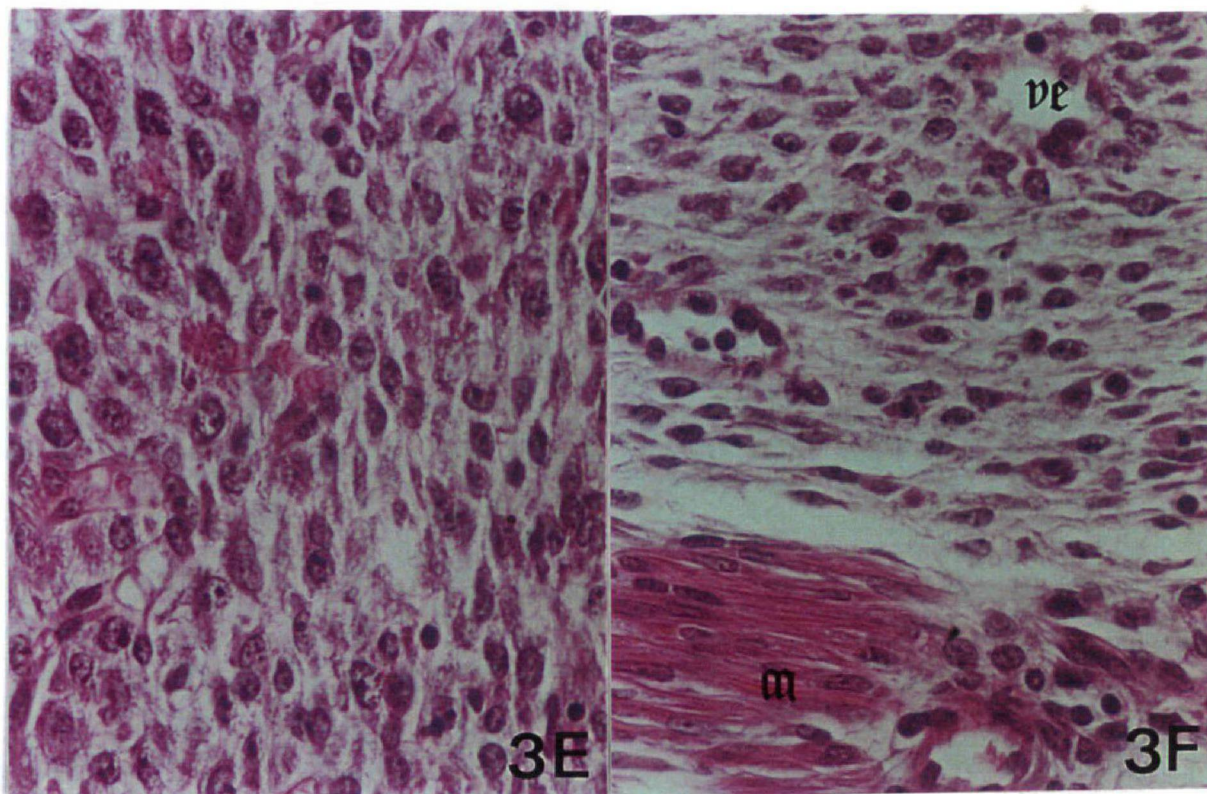
(Verso da página anterior: Legendas das figuras 3C e 3D)

3E - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células pré-decíduais. Observar que as células pré-decíduais são menos volumosas e menos compactadas do que as células decíduais maduras. 551,7x. HE.

3F - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células não decidualizadas. As células desta região apresentam características semelhantes aos fibroblastos do endométrio nulíparo. ve= vênula; m= miométrio. 551,7x. HE.

3G - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. Região de células pré-decíduais. Observar o mesmo padrão da região equivalente da decídua. 551,7x. HE.

3H - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. Região de células não-decidualizadas. Observa-se a mesma organização morfológica identificada na decídua. 551,7x. HE.



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 3E, 3F, 3G e 3H)

4.2.3 Distribuição de Laminina na Decídua e no Deciduoma

Os cortes de decídua de camundongos grávidos no dia 5 incubados com anticorpo anti-laminina mostraram positividade, ao contrário da ausência de laminina no endométrio nulíparo. A reação apresentou um padrão semelhante para o deciduoma do mesmo dia (Figuras 4A e 4B).

Como mencionado no capítulo sobre Material e Métodos, os cortes do deciduoma foram todos inicialmente tratados com uma solução proteolítica de tripsina 0,01% à 37°C durante 10 minutos, com o intuito de facilitar a exposição dos sítios antigênicos ao anticorpo primário. A digestão de tripsina promove uma melhor evidência da laminina, que forma uma estrutura semelhante à malhas na matriz extracelular (Figuras 4B, 4D e 4G).

Em aumentos maiores, pode-se observar forte marcação na região de células deciduais maduras tanto da decídua quanto do deciduoma. A positividade estava presente a nível intracelular (Figuras 4C e 4D) e ao nível de lâmina basal, tanto do epitélio uterino como nas vênulas (Figura 4D).

Nas regiões de células pré-deciduais - tanto na decídua de úteros grávidos como no deciduoma de úteros pseudográvidos - a reação também se manifestou a nível intracelular (Figuras 4E e 4G).

A Tabela 1 (p.51) identifica os graus de positividade observados.

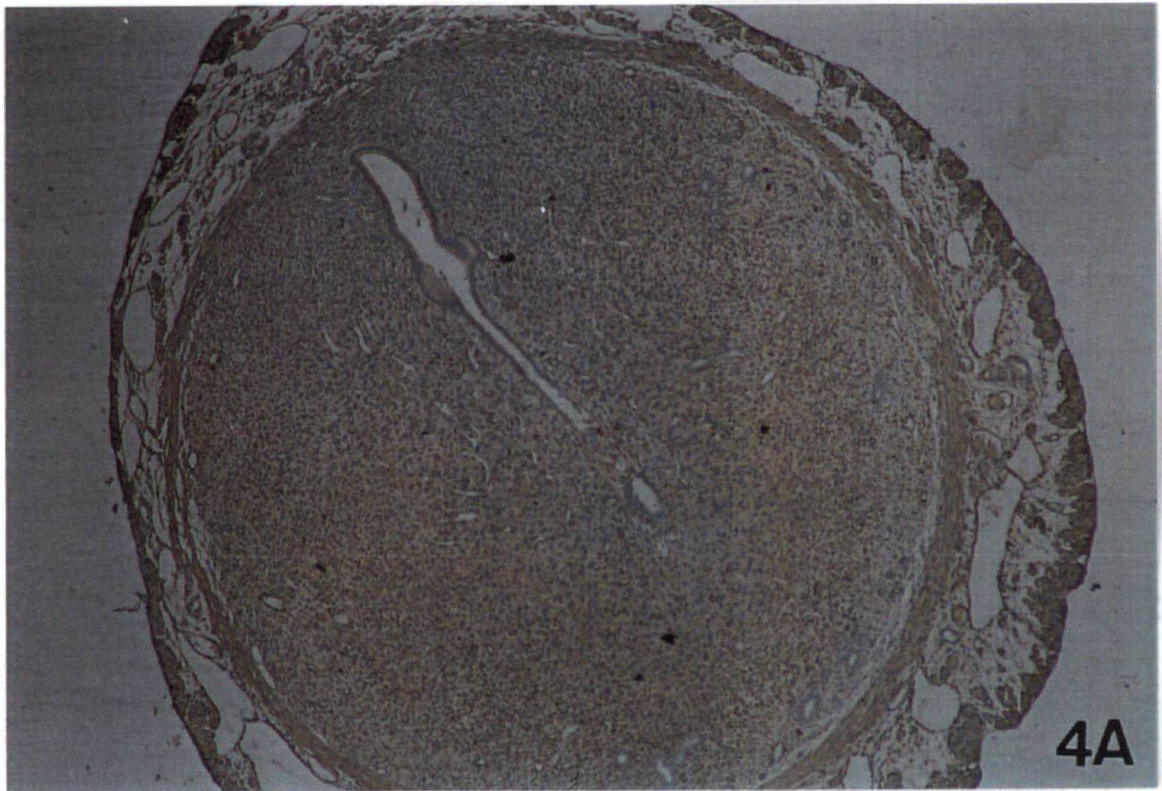
FIGURA 4

LAMININA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 5

4A - Visão panorâmica do útero grávido e decidualizado, incubado com anticorpo anti-laminina. É possível identificar a presença da glicoproteína no estroma endometrial grávido, especialmente na região pré-decidual. 55,1x.

4B - Visão panorâmica do útero pseudográvido tratado com tripsina a 0,01% e incubado com anti-laminina. Notar um padrão de distribuição da glicoproteína semelhante ao da decídua. Notar uma redução na intensidade de reação do endométrio pseudográvido. 55,1x.

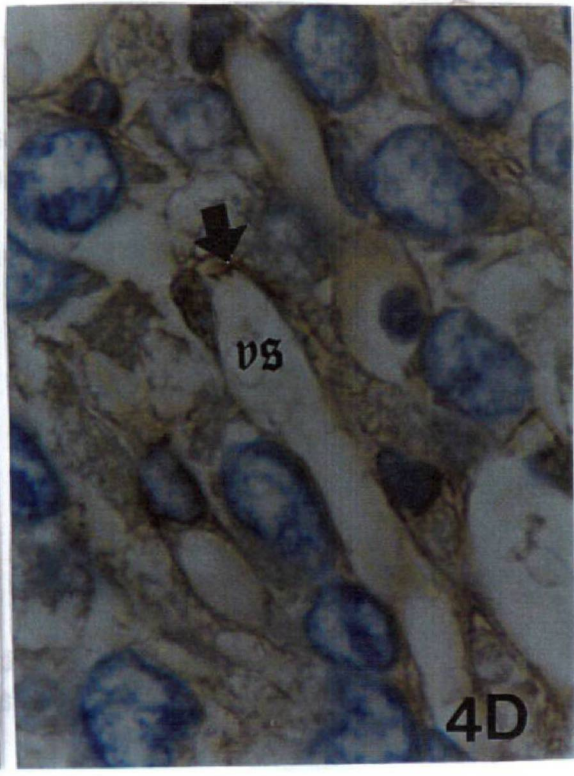
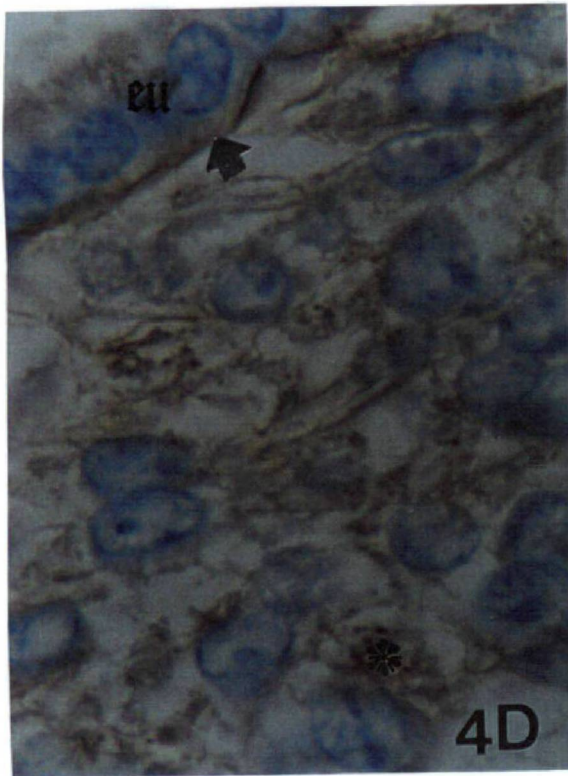
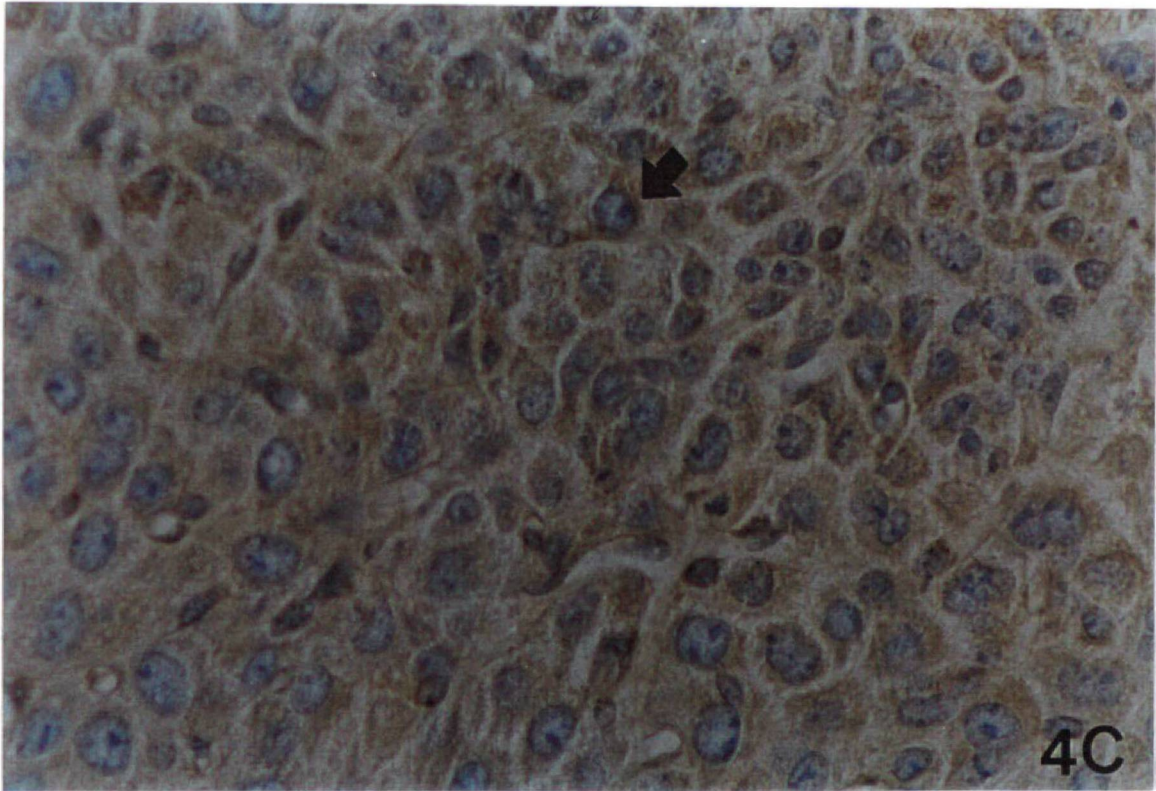
4.2.4 Documentação Fotográfica



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 4A e 4B)

4C - Região de células decíduais maduras na decídua. As células maduras apresentam marcação especialmente intracelular (seta). 551,7x.

4D - Aumento maior da mesma região no deciduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. Da mesma forma que na decídua, as células maduras apresentam positividade intracelular (asterisco). Notar também a presença de laminina na lâmina basal (seta) do epitélio uterino (eu), e lâmina basal (seta) de vasos sanguíneos (vs). 1379,4x.



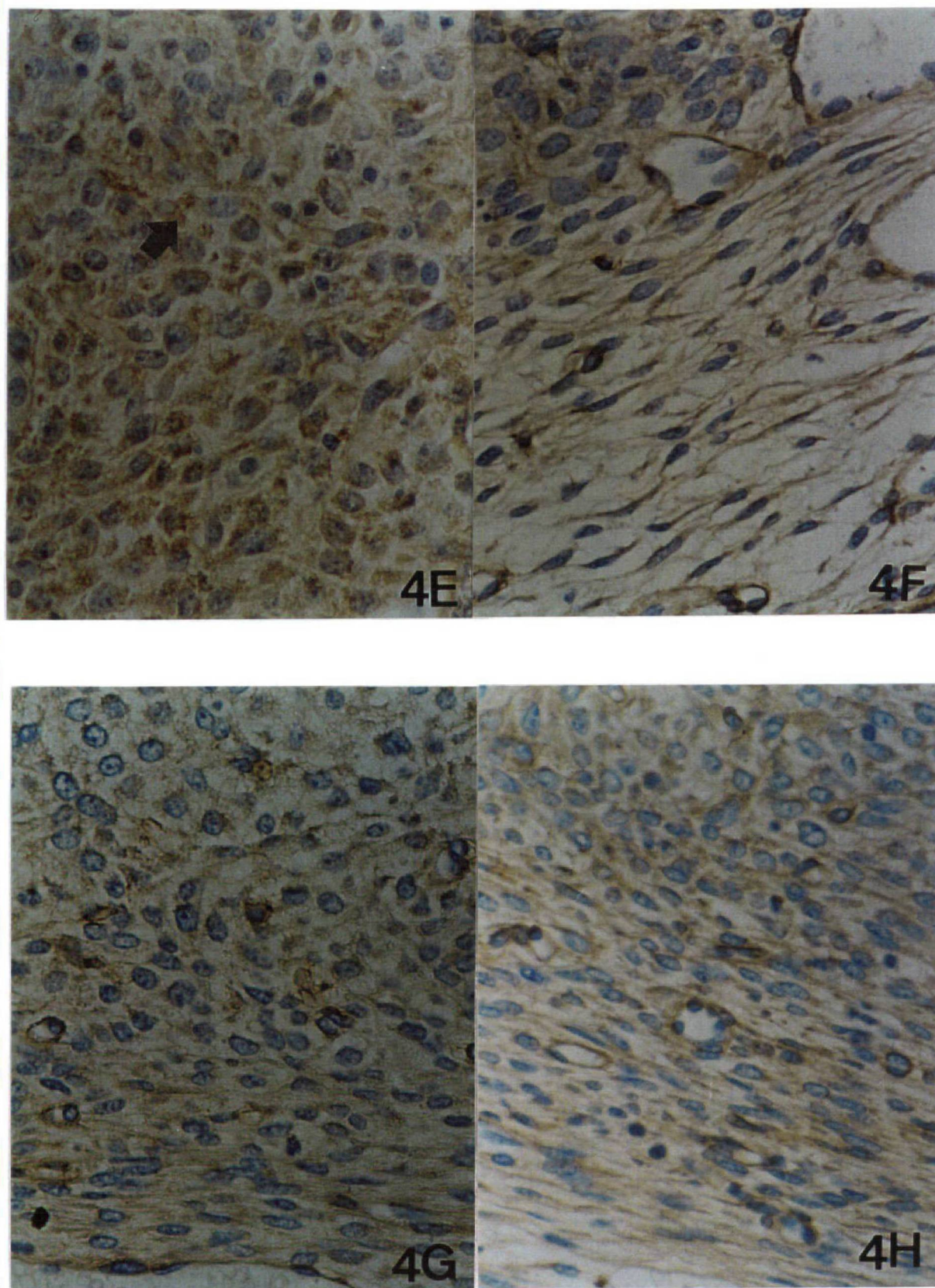
(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 4C e 4D)

4E - Região de células pré-decíduais da decídua. Há forte positividade intracelular para laminina (seta). 551,7x.

4F - Decídua no dia 5 da gestação. Região de células não decidualizadas. Ausência de marcação. 551,7x.

4G - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. Corte tratado com tripsina a 0,01%. Região de células pré-decíduais. Comparando-se com a região equivalente da decídua, percebe-se a presença de laminina nas células pré-decíduais do deciduoma. A marcação é mais difusa e mais fraca quando comparado à decídua 551,7x.

4H - Deciduoma no dia 5 da pseudogestação. Corte tratado com tripsina a 0,01%. Região de células não-decidualizadas. Ausência de marcação. 551,7x.



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 4E, 4F, 4G e 4H)

4.2.5 Distribuição de Fibronectina na Decídua e no Deciduoma

Nos cortes incubados com anticorpo anti-fibronectina observou-se muita semelhança no padrão de distribuição entre a decídua e o deciduoma. Em ambos os casos evidenciou-se positividade na camada de células pré-decíduais e não-decidualizadas (Figuras 5A, 5B, 5D e 5F), sendo mais evidente nesta última, em oposição ao útero nulíparo onde a marcação para fibronectina é muito forte em todo o estroma uterino (vide Figura 2D).

As regiões de células decíduais maduras, tanto de decídua como de deciduoma, apresentaram leve positividade intracelular. (Fig. 5-C e 5-E).

A Tabela 1 (p.51) identifica os graus de positividade observados.

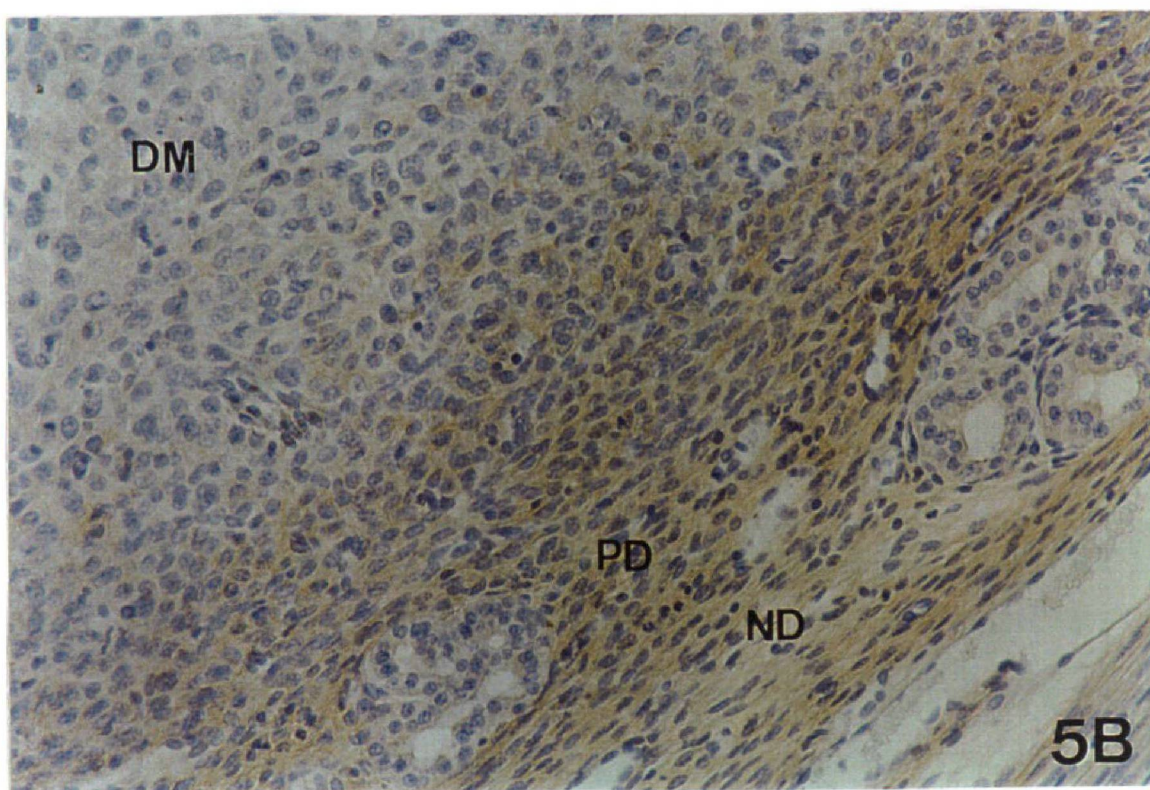
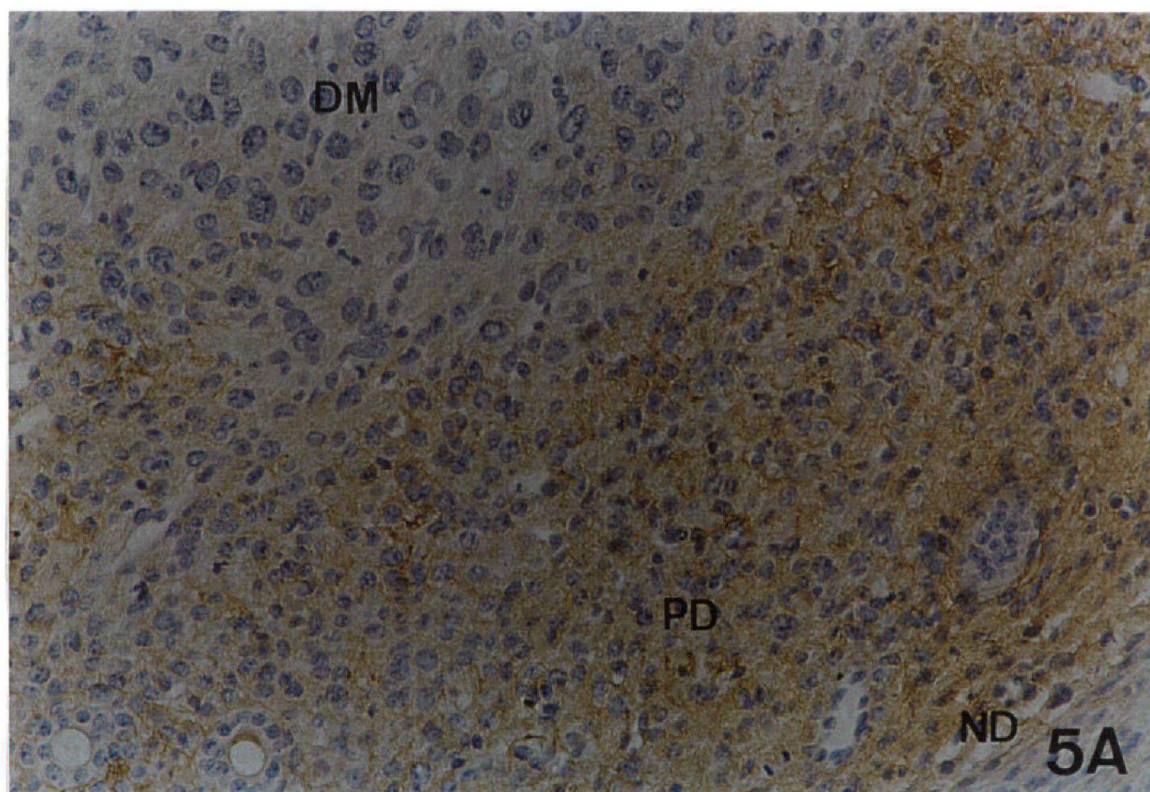
FIGURA 5

FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 5

5A – Decídua antimesometrial. Observar o padrão de distribuição da fibronectina nas três regiões da decídua: caracterizado pela discreta marcação na DM, marcação forte nas regiões PD e ND. 257,8x.

5B – Deciduoma antimesometrial tratado com tripsina a 0,01%. A distribuição de fibronectina no deciduoma é muito semelhante ao observado na decídua, ou seja, marcação fraca na DM e marcação forte nas regiões PD e ND. 257,8x.

4.2.6 Documentação Fotográfica



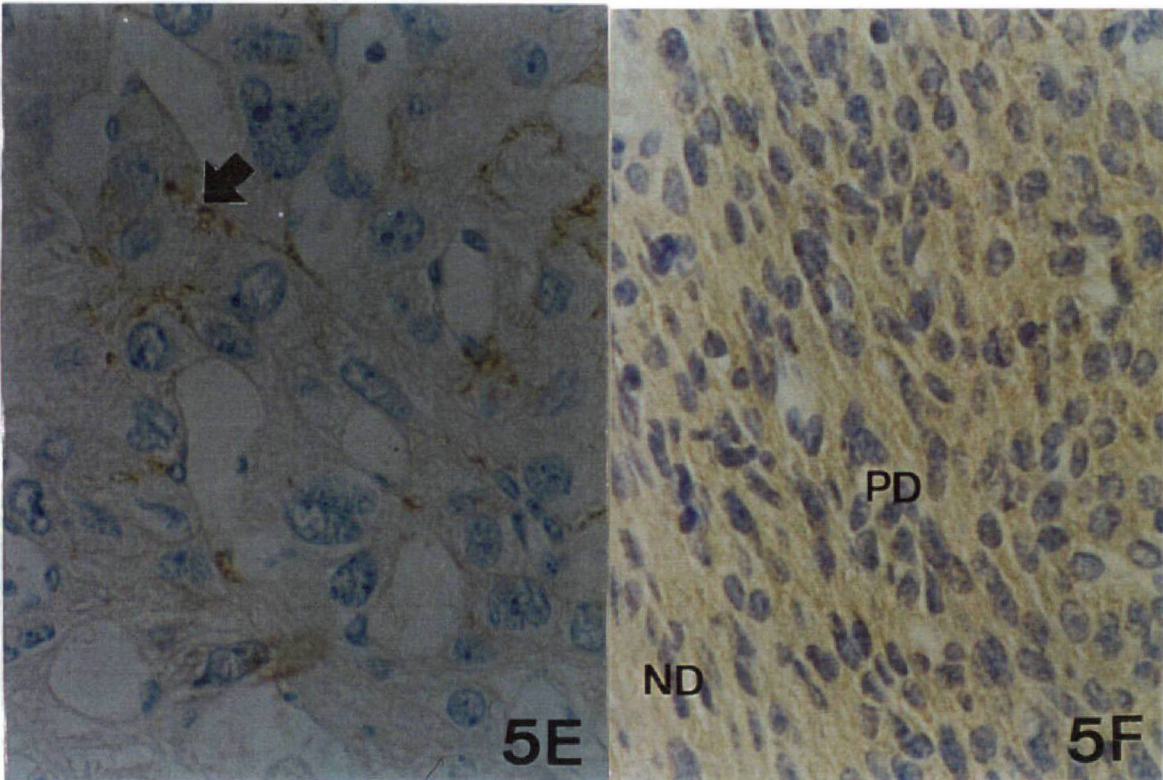
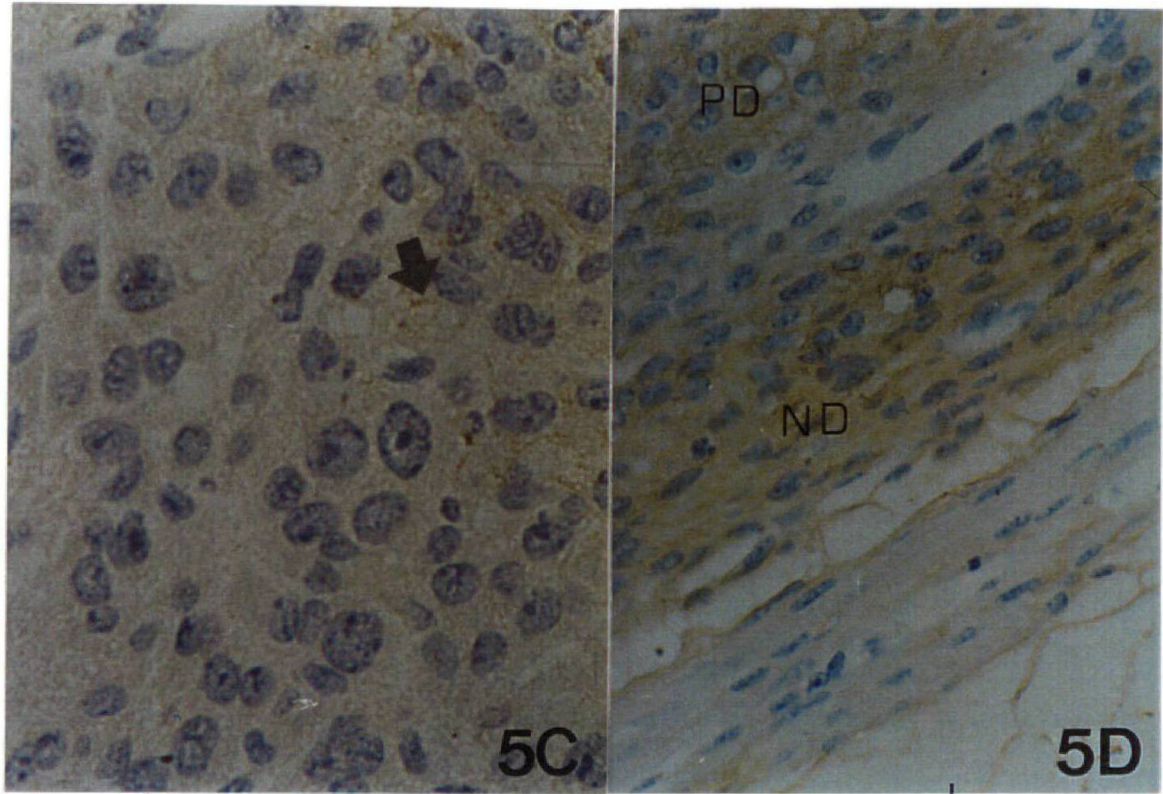
(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 5A e 5B)

5C - Região de células decíduais maduras da decídua antimesometrial. Constatar a leve positividade à reação (seta). 551,7x.

5D - Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) na decídua antimesometrial. Observar a positividade, principalmente na região não-decidualizada. 551,7x.

5E - Região de células decíduais maduras do decíduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. O tratamento enzimático mostra a presença da glicoproteína (seta) no citoplasma das células maduras. 551,7x.

5F - Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) no decíduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. 551,7x.



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 5C, 5D, 5E e 5F)

4.3 DIA 7 DE GESTAÇÃO E PSEUDOGESTAÇÃO

4.3.1 Morfologia do Endométrio na Decídua e no Deciduoma

Comparando-se os cortes transversais dos sítios de decidualização da região antimesometrial do dia 7 de útero grávido e pseudográvido corados pela hematoxilina e eosina, observou-se que ambos apresentavam um padrão muito semelhante de decidualização das células endometriais. Em ambos os casos, a maior parte do endométrio estava constituída pela região de células deciduais maduras, enquanto que o restante era constituído pelas outras duas regiões celulares: a região de células pré-deciduais e a região de células não-decidualizadas. A última era representada por uma delgada camada de fibroblastos endometriais onde estavam presentes algumas glândulas endometriais (Figuras 6A e 6B).

As células deciduais maduras, tanto na decídua como no deciduoma, apresentavam as mesmas características morfológicas, ou seja, as células são volumosas, com núcleos eucromáticos, sendo algumas polinucleadas. Os espaços intercelulares estavam muito reduzidos, devido à grande compactação entre as células deciduais. A presença de vasos sanguíneos era mais evidente no deciduoma. (Figuras 6C e 6E).

A estrutura morfológica das regiões pré-decidual e não-decidualizada apresentava o mesmo padrão anteriormente observado nos cortes do dia 5 (Figuras 6D e 6F).

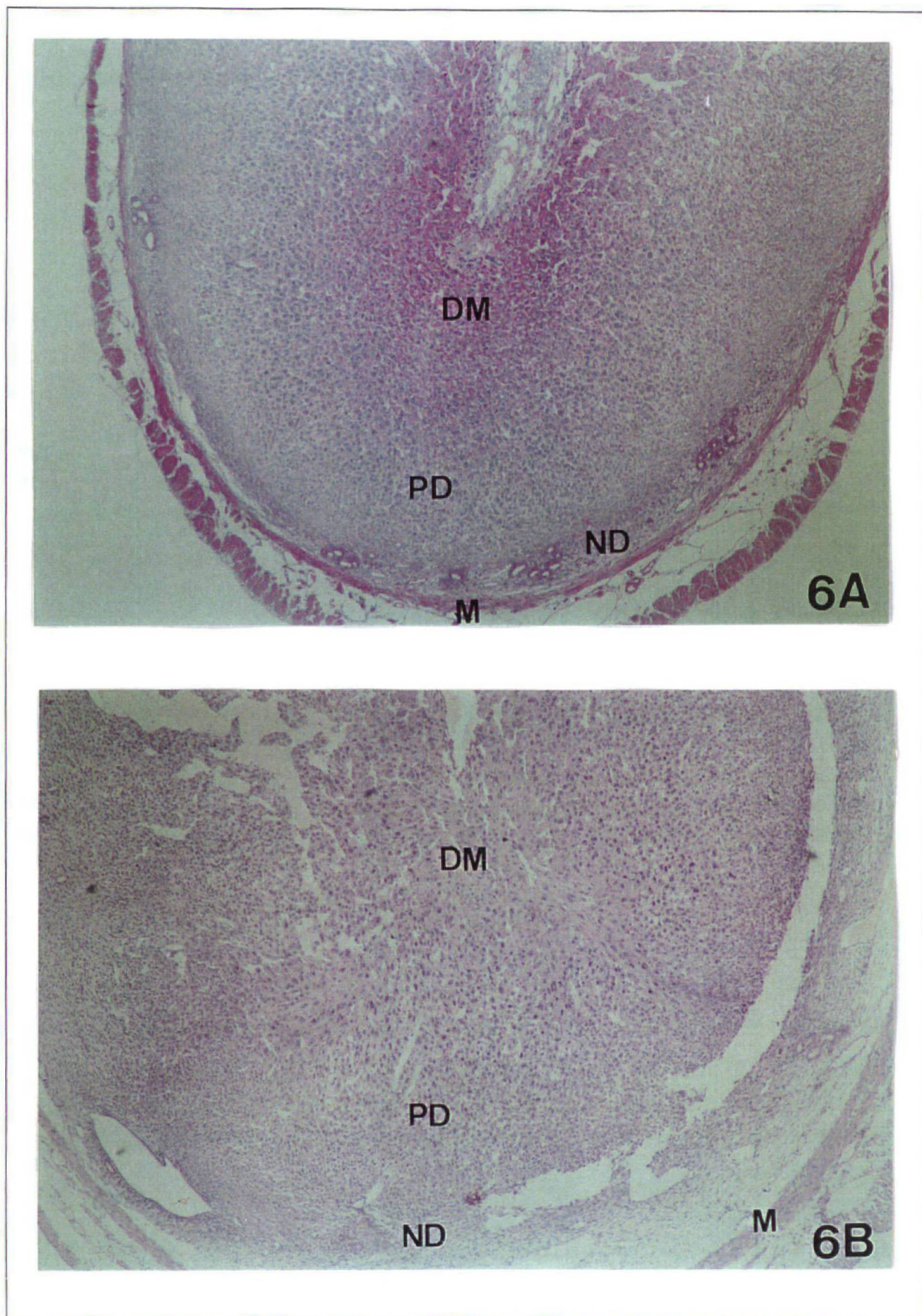
FIGURA 6

ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA DECÍDUA E DO DECIDUOMA NO DIA 7

6A - Visão panorâmica da decídua antimesometrial. Observar as regiões de decidualização: madura (DM); pré-decidual (PD) e não-decidualizada (ND). Notar o acentuado crescimento da DM. M= miométrio. 55,1x. HE.

6B - Deciduoma antimesometrial. Observar as mesmas regiões de decidualização: DM, PD e ND. M= miométrio. 55,1x. HE.

4.3.2 Documentação Fotográfica



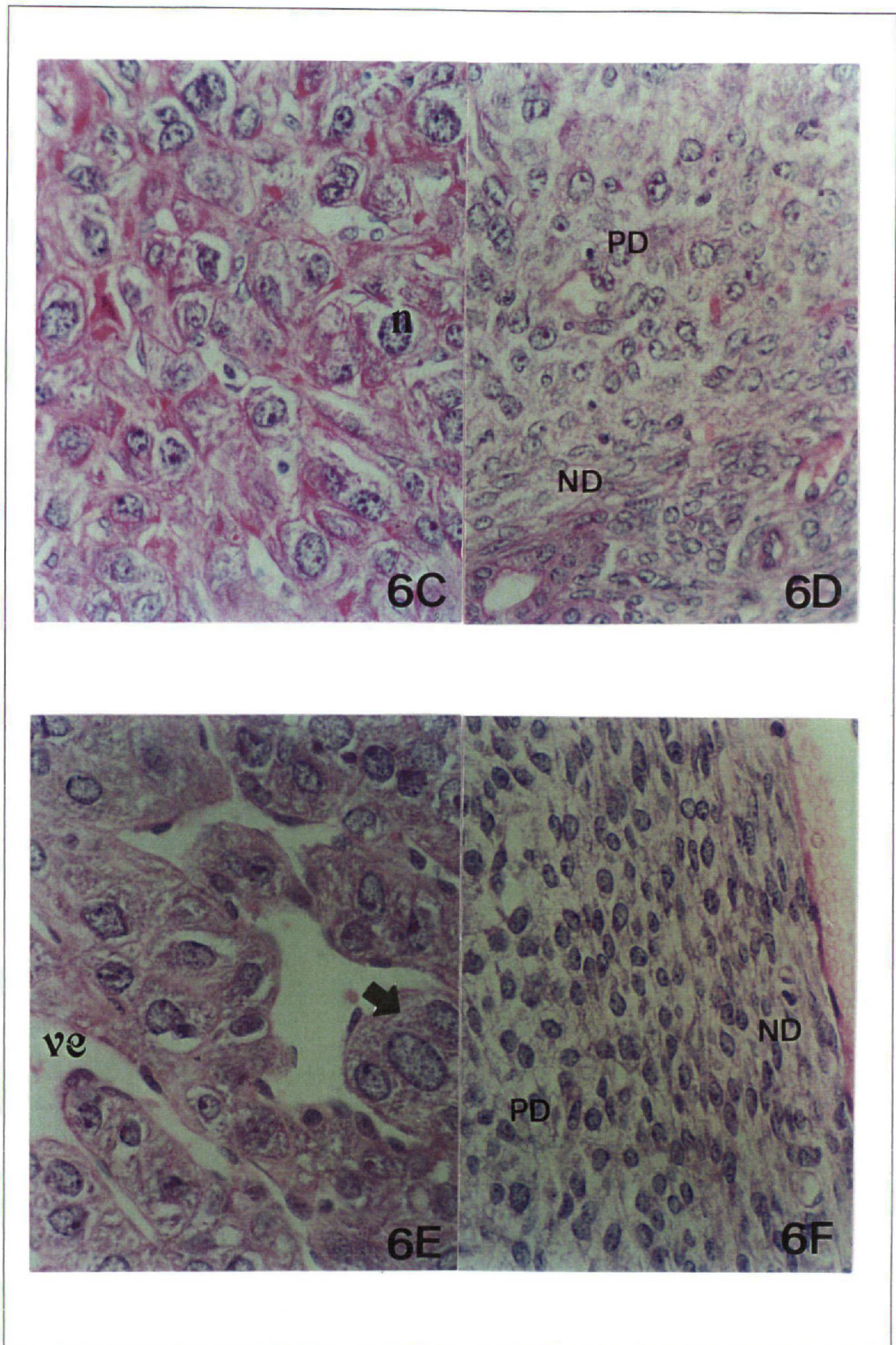
(Verso da página anterior: Legendas das figuras 6A e 6B)

6C - Região de células decíduais maduras. As células são volumosas e compactadas; núcleos grandes (n) e eucromáticos, com nucléolos evidentes. 551,7x. HE.

6D - Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) da decídua. As características morfológicas das células respeitam as mesmas características das regiões equivalentes da decídua do dia 5. 551,7x. HE.

6E - Região de células decíduais maduras do decíduoma. Observar as mesmas características das células maduras da decídua (seta), bem como a presença de vênulas (ve). 551,7x. HE.

6F - Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) do decíduoma. 551,7x. HE.



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 6C, 6D, 6E e 6F)

4.3.3 Distribuição de Laminina na Decídua e no Deciduoma

A visão panorâmica dos cortes de decídua e deciduoma na porção anti-mesometrial do dia 7, incubados com anticorpo anti-laminina, apresentaram padrão de positividade semelhante. A glicoproteína estava presente em áreas mais distantes do lúmen uterino onde a reação era mais evidente. Nas áreas próximas ao lúmen, que compreendem apenas a região de células maduras, a reação imunocitoquímica foi fraca.

Entretanto, em observações realizadas num aumento maior, pode-se perceber que as células deciduais maduras apresentam laminina tanto na superfície celular como também ao nível dos vasos sangüíneos.

As células maduras do deciduoma apresentaram positividade intracelular, indicando que ainda há síntese da glicoproteína. (Figuras 7C e 7C-Encarte; Figura 7E e 7E-Encarte).

As células pré-deciduais de útero grávido apresentaram positividade à laminina na superfície celular (Figura 7D), enquanto que as mesmas células no deciduoma apresentavam positividade intracelular (Figura 7F).

A Tabela 1 (p.51) identifica os graus de positividade observados.

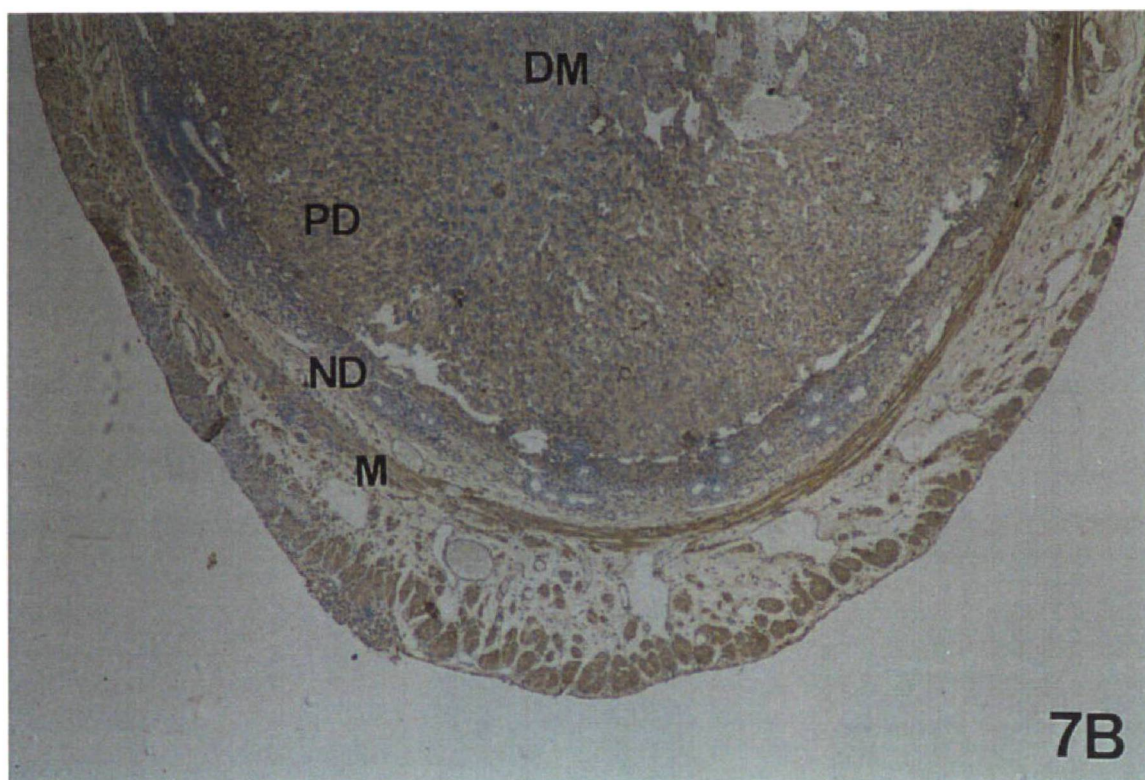
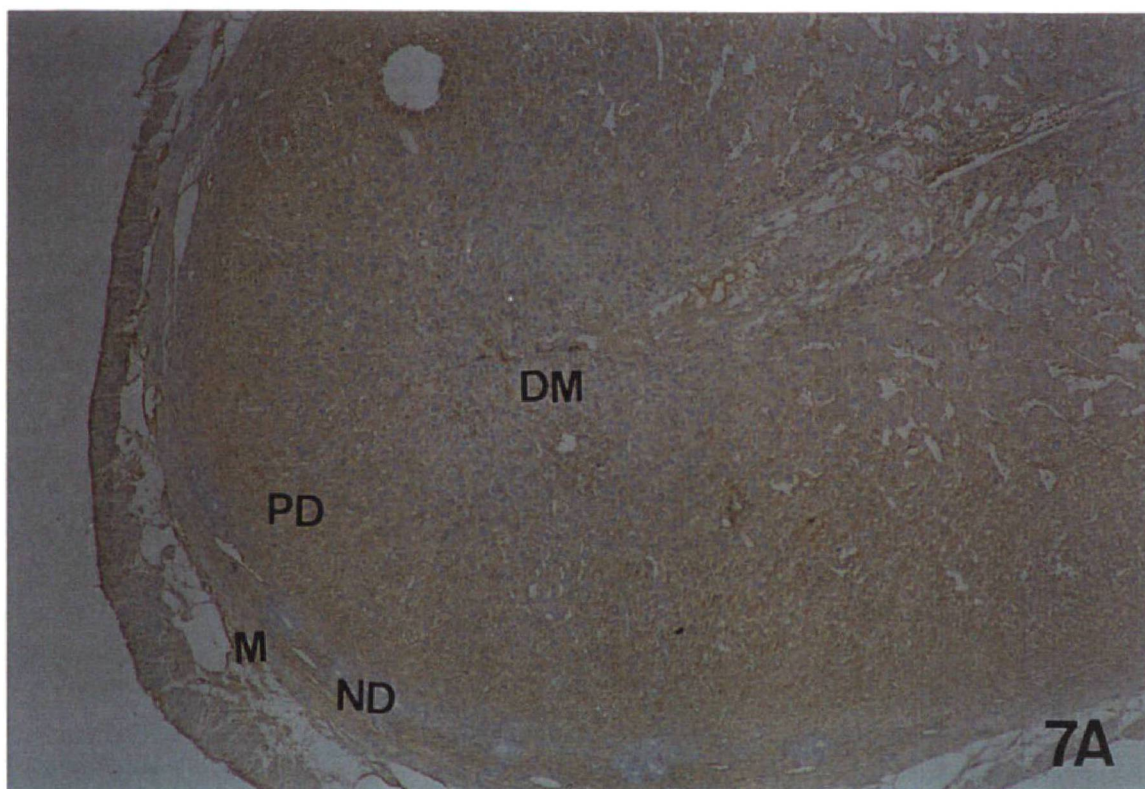
FIGURA 7

LAMININA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 7

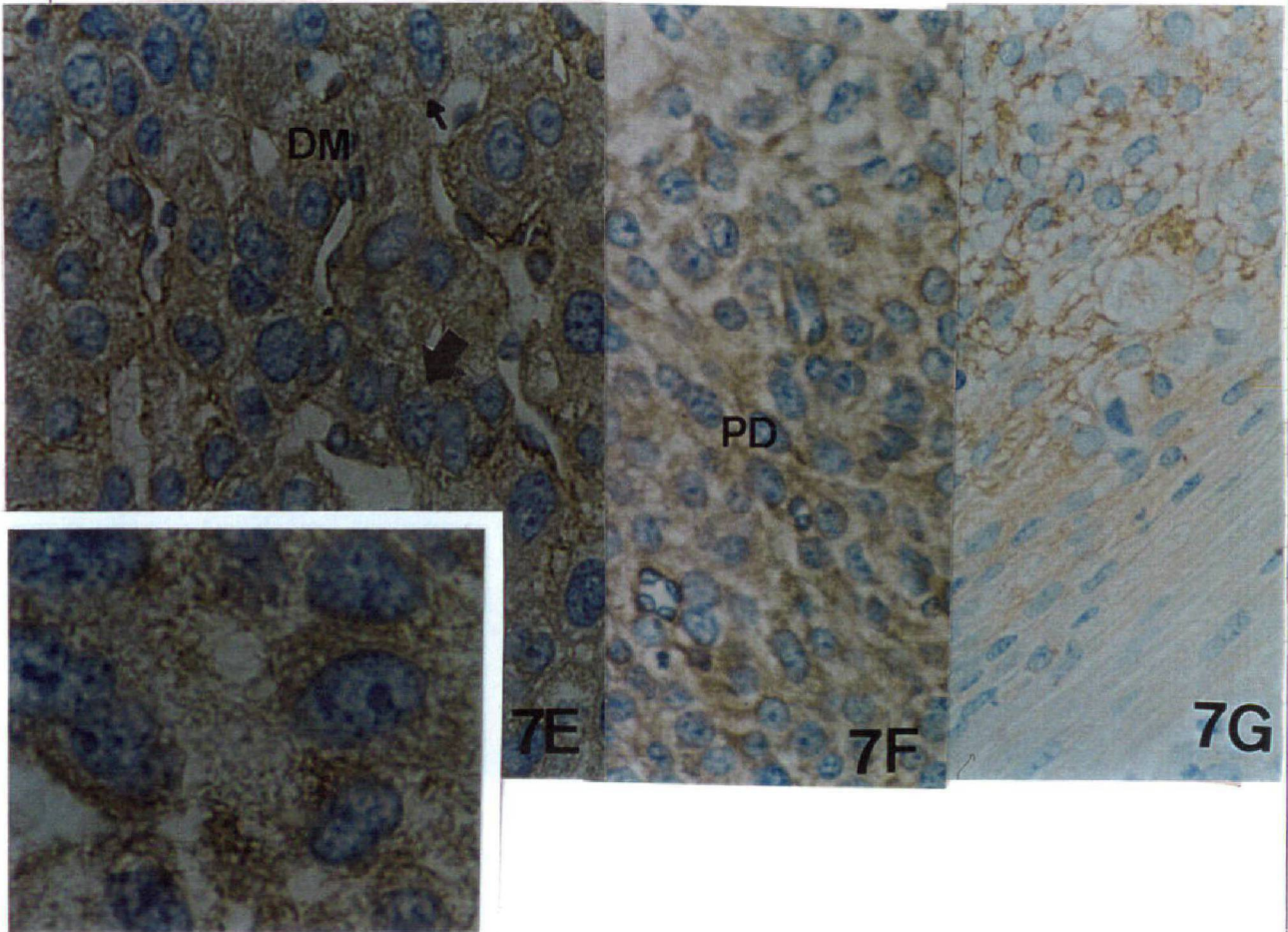
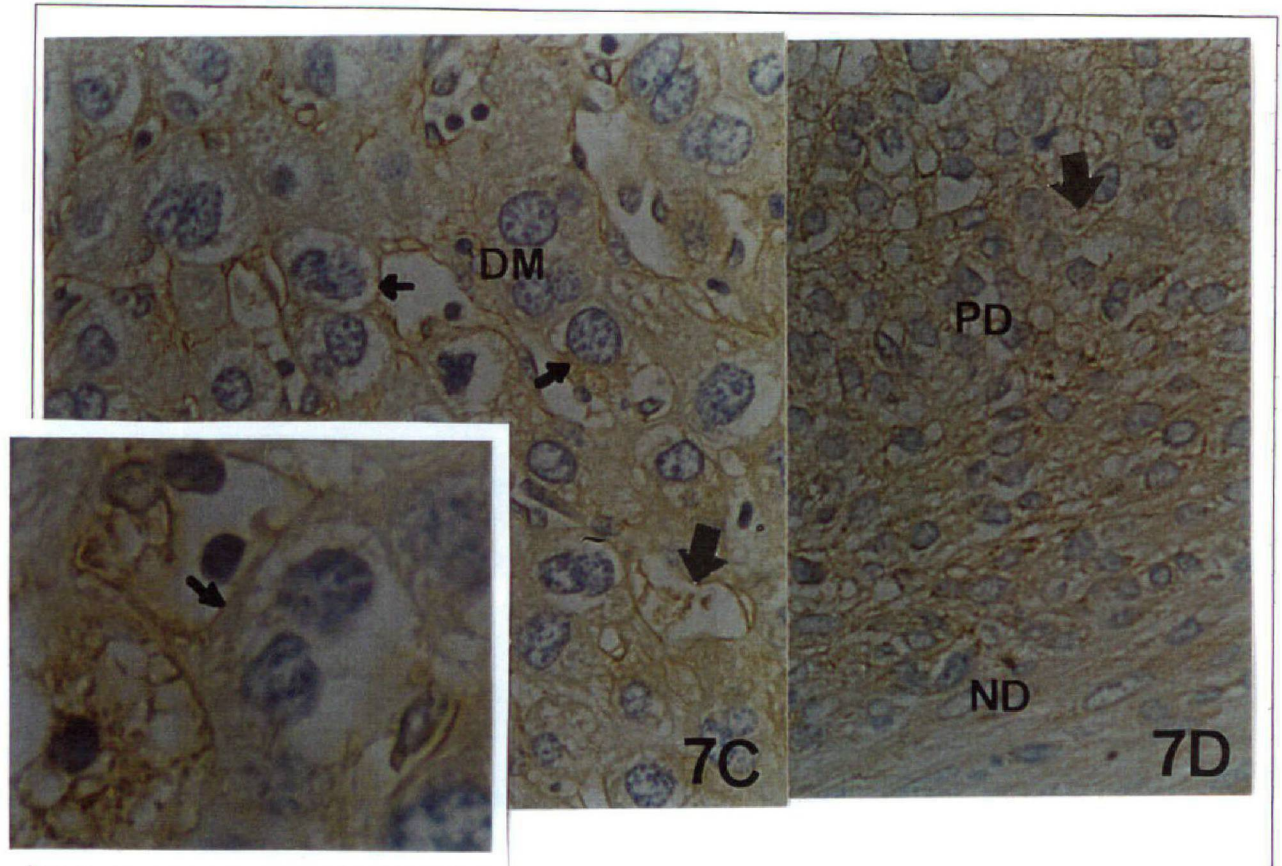
7A - Visão panorâmica da distribuição de laminina na decídua. A positividade está mais evidente na região pré-decidual (PD). DM= região de células decíduais maduras; ND= região de células não-decidualizadas; M= miométrio. 55,1x.

7B - Visão panorâmica da distribuição de laminina no deciduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. A região de células pré-decíduais (PD) apresenta maior intensidade de reação, tal como na decídua. DM= região de células decíduais maduras; ND= região de células não-decidualizadas; M= miométrio. 55,1x.

4.3.4 Documentação Fotográfica



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 7A e 7B)



(Verso da página anterior: Legendas das figuras 7C, 7D, 7E, 7F e 7G)

4.3.5 Distribuição de Fibronectina na Decídua e Deciduoma

Os cortes de decídua e deciduoma antimesometrial no dia 7 da gestação, incubados na presença do anticorpo anti-fibronectina, apresentaram positividade à glicoproteína, principalmente na região de células não-decidualizadas, enquanto que, nas regiões de células maduras, a glicoproteína parece estar em diminuta quantidade (Figuras 8A e 8B). Os cortes de deciduoma tratados com tripsina confirmaram a grande quantidade de fibronectina no estroma não-decidualizado (Figura 8B).

Em aumentos maiores, pode-se constatar que a fibronectina está presente na região de células maduras, tanto na decídua como no deciduoma, apenas nos estreitos espaços intercelulares (Figuras 8C e 8E). A inexistência de marcação intracelular provavelmente indica que as células maduras não mais sintetizam a glicoproteína.

As células pré-deciduais apresentam pouca positividade intracelular (Figuras 8D e 8F).

Observando a região de células não-decidualizadas, nota-se a marcante positividade à glicoproteína, especialmente nos cortes de deciduoma (Figuras 8D e 8F).

A Tabela 1 (p.51) identifica os graus de positividade observados.

FIGURA 8

FIBRONECTINA NA DECÍDUA E NO DECIDUOMA DO DIA 7

8A – Visão panorâmica da decídua. Observar a forte positividade na região de células não-decidualizadas (ND). DM= região de células deciduais maduras; PD= região de células pré-decidualizadas; M= miométrio. 257,8x.

8B – Visão panorâmica do deciduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. Observar da mesma forma a forte positividade para a fibronectina na região de células não decidualizadas (ND). DM= região de células deciduais maduras; PD= região de células pré-decidualizadas; M = miométrio. 257,8x.

7C - Região de células decíduais maduras (DM) na decídua. Observar que a lamini-
na está presente na superfície das células decíduais (setas menores) e na lâ-
mina basal de vasos sanguíneos (seta maior). 551,7x.

Encarte: Detalhe em grande aumento. Observar a marcação nos reduzidos es-
paços intercelulares. 1379,4x.

7D - Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizadas (ND) na decídua.
Observar a positividade na periferia das células da região pré-decidualizada
(seta). 551,7x.

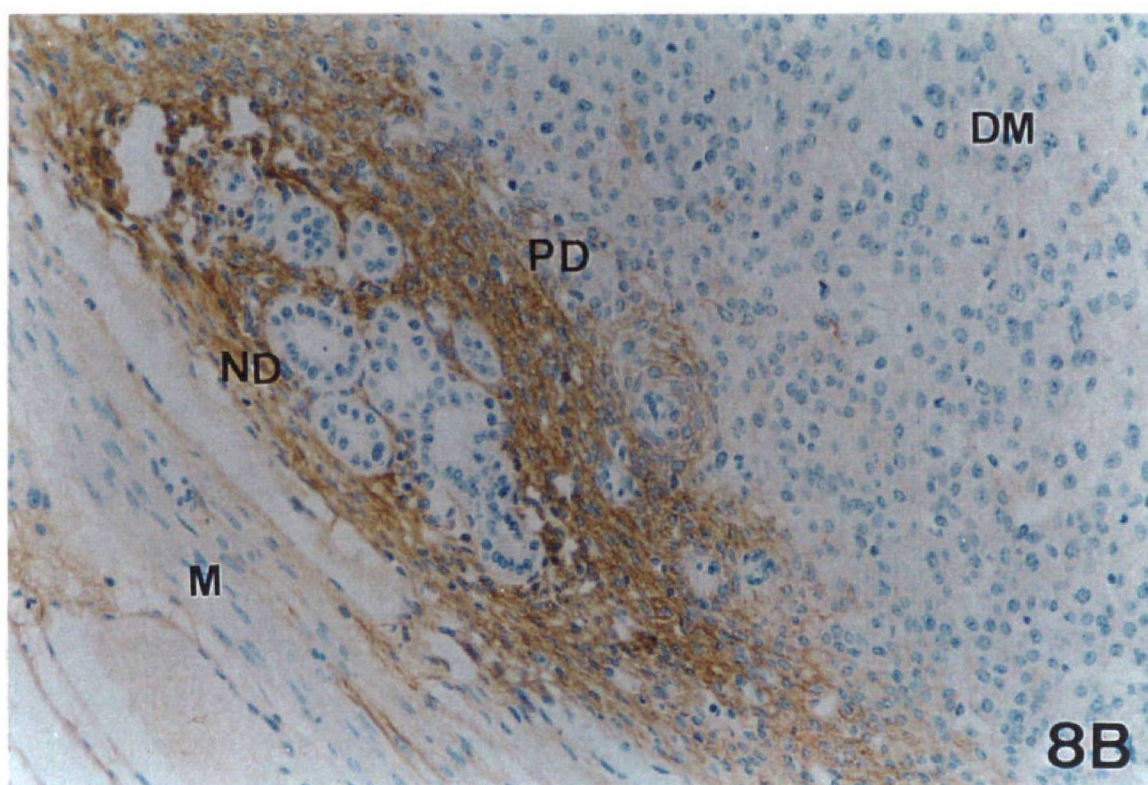
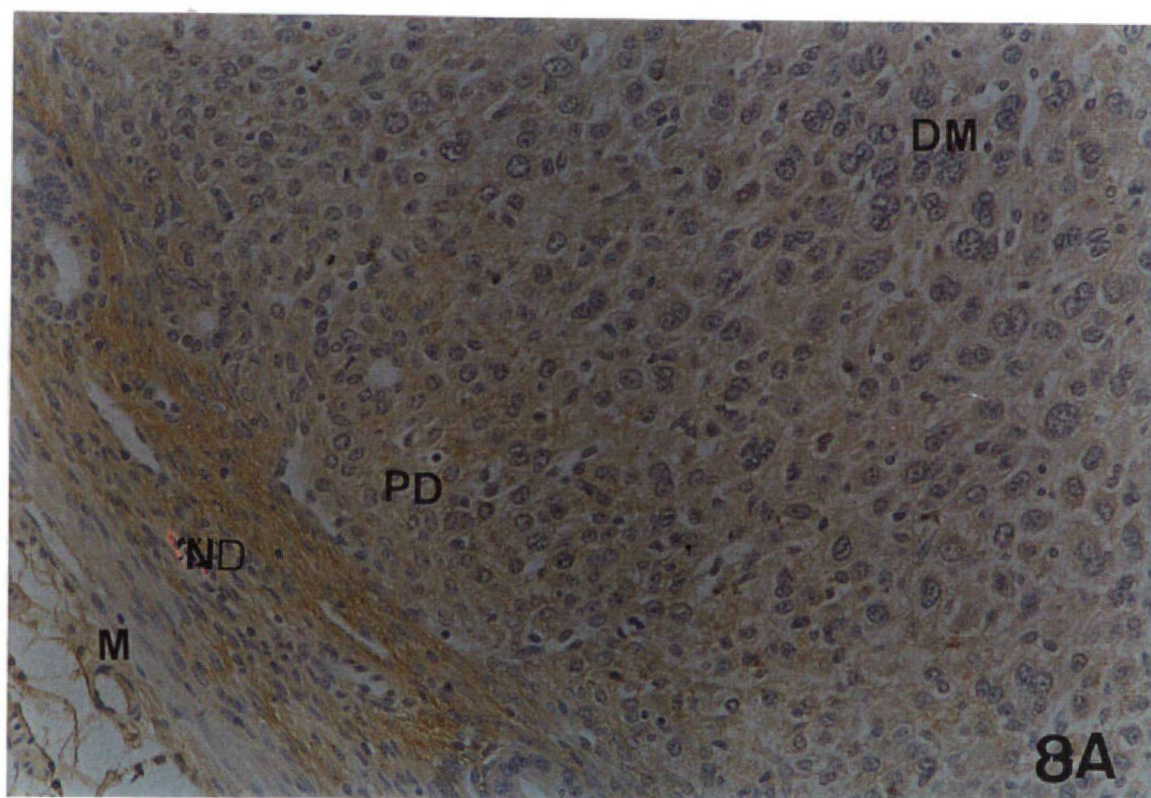
7E - Região de células decíduais maduras (DM) no decíduoma. Corte tratado com
tripsina a 0,01%. Após o tratamento enzimático a positividade permanece na
superfície celular (seta menor) e também se manifesta no citoplasma das cé-
lulas maduras (seta maior). 551,7x.

Encarte: Detalhe em grande aumento. 1379,4x.

7F - Região de células pré-decíduais (PD) no decíduoma. Corte tratado com tripsina
a 0,01%. Observar a positividade intracelular. 551,7x.

7G - Região de células não-decidualizadas (ND) no decíduoma. Corte tratado com
tripsina a 0,01%. 551,7x.

4.3.6 Documentação Fotográfica



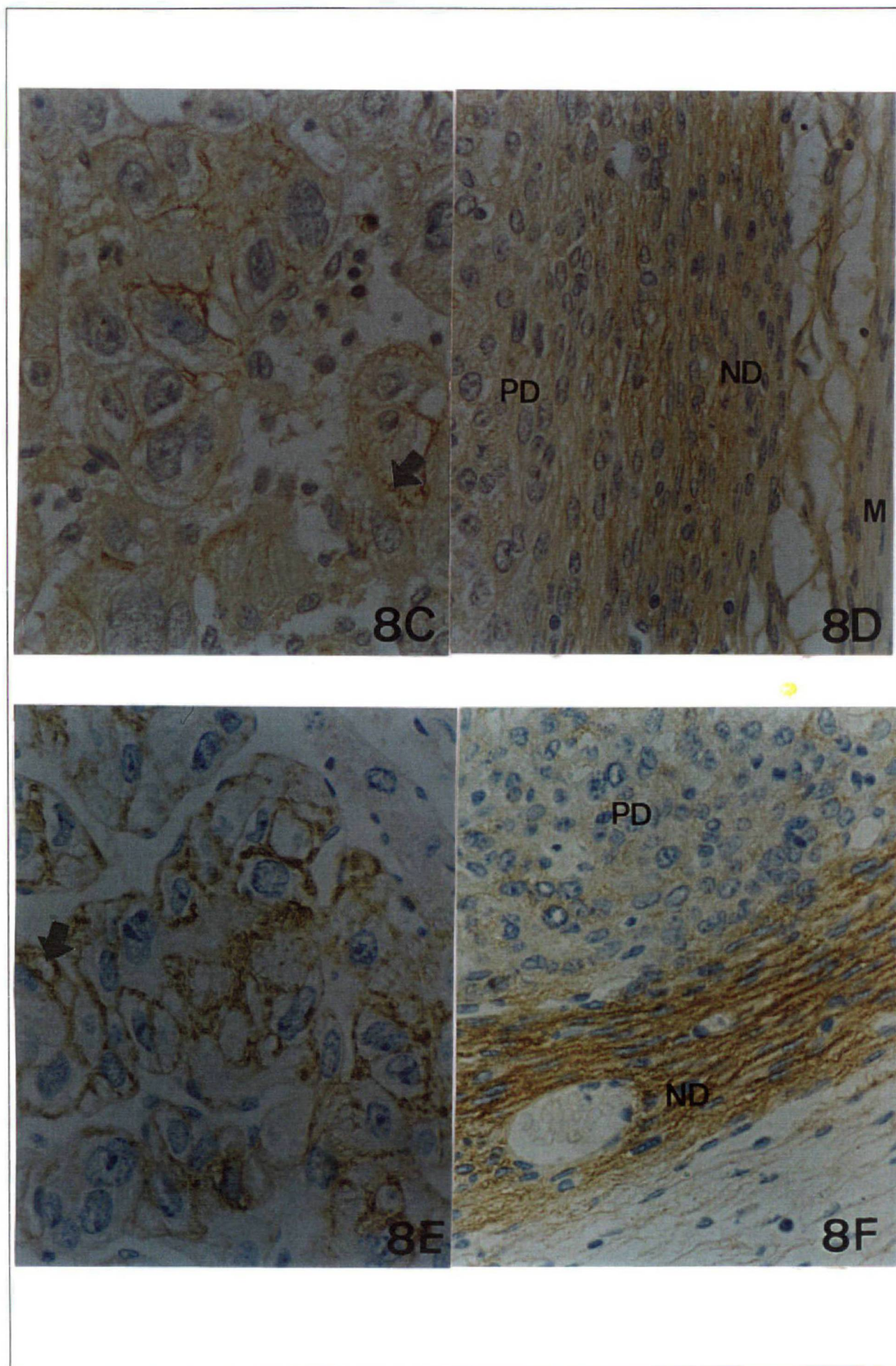
(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 8A e 8B)

8C – Região de células decíduais maduras da decídua. Observar a presença de fibronectina circundando as células decíduais (seta). 551,7x.

8D – Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) na decídua. Observar marcação forte na ND e ausência de marcação no miométrio (M). 551,7x.

8E – Região de células decíduais maduras do decíduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. Notar a mesma distribuição observada na decídua (seta). 551,7x

8F – Região de células pré-decíduais (PD) e não-decidualizada (ND) no decíduoma. Corte tratado com tripsina a 0,01%. O mesmo padrão da decídua se repete. 551,7x.



(Verso da página anterior: Legendas das Figuras 8C, 8D, 8E e 8F)

Tabela 1

Comparação da marcação de laminina e fibronectina para os cortes de útero nulíparo e da decídua e deciduoma dos dias 5 e 7 de gestação e pseudogestação.				
Fase	Endométrio	Região	Laminina	Fibronectina
Nulíparo	Estro		-	++
Dia 5	Decídua	DM	+	-/+
		PD	+	++
		ND	-	++
	Deciduoma*	DM	+	-/+
		PD	+/-	++
		ND	-	++
Dia 7	Decídua	DM	+	-/+
		PD	+	+
		ND	-	++
	Deciduoma*	DM	+	-/+
		PD	+	+
		ND	-/+	++

* Tratamento prévio com tripsina 0,01%	- Ausência de marcação
DM Região de células decidualizadas	-/+ Marcação fraca
PD Região de células pré-decidualizadas	+ Marcação moderada
ND Região de células não decidualizadas	++ Marcação forte

5. DISCUSSÃO

5.1 MORFOLOGIA DO ENDOMÉTRIO NÃO-GRÁVIDO, GRÁVIDO E PSEUDOGRÁVIDO

O primeiro grupo de resultados a ser discutido neste trabalho, refere-se à organização histológica do endométrio não-grávido, da decídua e do deciduoma.

Nossas observações dos cortes de útero não-grávido corados pela hematoxilina e eosina mostraram que, na região antimesometrial, as células mais numerosas do estroma uterino são aquelas identificadas morfológicamente como fibroblastos endometriais. Segundo a literatura, independentemente da fase do ciclo estral, tais células nos camundongos não-grávidos são irregulares, ricas em prolongamentos e separadas por grande quantidade de matriz extracelular (MEC) (Abrahamsohn, 1993; Finn, 1977; Soares Greca et al., 2000).

O estroma endometrial humano, durante o ciclo menstrual e a gravidez, desenvolve considerável remodelação e transformação necessárias para os processos de secreção, menstruação e decidualização (Fleming, 1997). A implantação do blastocisto pode ser vista como uma seqüência de eventos bioquímicos que se refletem nas alterações fenotípicas das células do endométrio secretor, onde vários fatores estão envolvidos nos processos de adesão entre células, e entre estas e o substrato (Grosskinky, 1996).

A decidualização é um fenômeno de extrema importância para o organismo materno pois é responsável pelo controle da invasão do trofoblasto durante a gestação. Isto é facilmente comprovado quando se observam casos de implantação em locais onde não ocorre a decidualização, por exemplo, nas tubas uterinas, onde

o trofoblasto apresenta evidente dificuldade de invasão (Loke et al., 1995).

Em camundongos, duas regiões de decidualização são estabelecidas no endométrio. Na porção antimesometrial, forma-se a primeira região de células decidualizadas ao redor da cripta uterina onde se encontra o embrião (Mossman 1987, Romagnano, 1996), e por esse motivo, elegeu-se essa região para estudo neste trabalho. Na região mesometrial a decidualização ocorre a partir do 8º dia da implantação do trofoblasto e corresponderá, mais tarde, à zona de invasão secundária do mesmo. No desenvolvimento desse processo, as células formam complexos juncionais que contribuem para a coesão do tecido (O'Shea et al., 1983; Ono et al., 1989). Nos camundongos, o desenvolvimento máximo da decídua se dá no 7º DG ou da pseudogestação. Com base nessas informações é que foram escolhidos como objeto de estudo deste trabalho o dia 5, que corresponde ao início da decidualização, e o dia 7, a partir do qual já há indícios de degeneração celular (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

A análise dos cortes de útero nos dias 5 e 7 da gestação revelaram uma organização semelhante à relatada por Moosman (1987), ou seja, presença de células deciduais maduras nas cercanias da cripta de implantação do blastocisto. Abrahamsohn e Zorn (1993) descrevem as mesmas características morfológicas das células deciduais observadas neste trabalho, ou seja, aumento do volume celular, arredondamento das células com perda de prolongamentos das mesmas, aumento do volume do núcleo, além de redução dos espaços intercelulares. Segundo a literatura, no nível ultra-estrutural, as células deciduais também exibem um aumento do número de organelas envolvidas com a síntese de macromoléculas, acúmulo de lipídeos, filamentos intermediários e estabelecem junções intercelulares umas com as outras (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

O endométrio que rodeia a camada de células deciduais maduras é a re-

gião de células pré-decíduais, que é constituída por células que apresentam características morfológicas de transição entre as células decíduais maduras e os fibroblastos. Estas células apresentam-se mais alongadas com prolongamentos e separadas por espaços extracelulares mais amplos que os da camada de células decidualizadas maduras. É comum encontrar na região pré-decidual células em divisão, uma vez que nos dias subseqüentes tais células irão integrar a região decidualizada. Estas células também passam a expressar filamentos intermediários de desmina e a estabelecer junções (Abrahamsohn, 1993; Oliveira et al., 2000).

Na região mais externa do endométrio, adjacente ao miométrio, observamos células fusiformes, morfológicamente semelhantes a fibroblastos, como aqueles encontrados no endométrio dos animais não-grávidos. Nesse caso os espaços extracelulares eram muito evidentes. Nossas descrições são totalmente condizentes com aquelas relatadas por Abrahamsohn (1993) e Soares Greca et al., (2000).

A transformação dos fibroblastos do tecido conjuntivo endometrial é decisiva para a modificação desses em células decíduais. Os fibroblastos endometriais apresentam funções de fibroblastos comuns enquanto o animal não está grávido. Entretanto, durante a gravidez, ocorrem modificações metabólicas que incluem a produção de novas proteínas de matriz extracelular como colágeno tipo V (Teodoro, 1995), proteoglicanas (Zorn et al., 1995; Greca et al., 1998; Soares Greca et al., 2000) e outros componentes da matriz extracelular como as glicoproteínas laminina e fibronectina, objetivos deste estudo.

Em roedores, o estímulo para a reação decidual é provido pelo embrião. No entanto, uma reação similar pode ocorrer por uma estimulação artificial do útero hormonalmente sensibilizado do animal (De Feo, 1967). Além do estímulo mecânico, a introdução de várias substâncias, como óleo e polissacarídeos, no lúmen uterino podem induzir a reação decidual (Finn e Keen, 1963). Em 1908, Loeb, após obser-

var que a estimulação artificial do endométrio pseudográvido resultava numa estrutura igual à decídua e, provavelmente, por correlacioná-la com uma estrutura com características de um tumor, denominou-a 'deciduoma'. Sabe-se, atualmente, que o deciduoma apresenta características morfológicas razoavelmente semelhantes à decídua. Curiosamente, por razões que não sabemos explicar, poucos são os estudos existentes sobre a estrutura do deciduoma induzido em roedores, especialmente em camundongos.

Um dos mais recentes estudos sobre deciduoma de camundongos foi realizado por Monice (1998). A autora relata em seu trabalho que, durante a formação do deciduoma, há uma variação no padrão das dilatações que se desenvolvem ao longo dos cornos uterinos após a injeção de óleo no lúmen. Esta observação também foi verificada no presente estudo. Foram observados nódulos espaçados e intercalados com regiões não dilatadas, morfológicamente semelhantes aos chamados sítios de interimplantação característicos da gestação normal.

Outro padrão observado foram dilatações homogêneas ao longo de todo ou de grande parte do corno uterino. Esse parece ser um comportamento comum na resposta decidual induzida, uma vez que resultados semelhantes foram obtidos em ratas por De Feo (1963) e Lino da Costa (1991), e em camundongos por Andrade (1993). Segundo De Feo (1967), duas variáveis tempo-dependentes estariam envolvidas nessas duas variedades de resposta: 1) o período de duração da máxima sensibilidade uterina ao estímulo deciduogênico e; 2) o período de ação do estímulo indutor. A sincronização destas duas variáveis produziria um deciduoma maciço, enquanto que a ausência do sincronismo levaria ao desenvolvimento do deciduoma na forma nodular (De Feo, 1967). Finn (1971) propõe que o posicionamento do óleo pode decorrer tanto de contrações direcionais do miométrio quanto da existência de locais de maior adesão na superfície das células epiteliais, os quais estariam locali-

zados preferencialmente na porção antimesometrial do útero.

Andrade et al. (1996) estudaram a formação do decíduoma em útero de camundongos fêmeas pseudográvidas através da injeção intra-uterina de óleo de arachis. Observaram que a decidualização do endométrio só ocorre quando existe um contato direto e amplo entre o óleo injetado e o epitélio luminal. Existe, portanto, uma estreita relação entre a distribuição do óleo e a resposta desencadeada pelo endométrio.

Um outro item a ser discutido se refere às regiões de células em diferentes níveis de decidualização no decíduoma. Em seus estudos, Andrade (1993) verificou que, no dia 5 de pseudogestação, havia claramente o estabelecimento de 3 regiões: 1) região de células decidualizadas subjacente ao epitélio, onde as células se apresentavam arredondadas em um arranjo compacto; 2) região de células pré-decidualizadas, onde as células apresentavam características intermediárias entre células plenamente decidualizadas e fibroblastos; 3) região de células não decidualizadas constituídas por fibroblastos que não sofreram transformação.

No presente trabalho enfatizou-se, através da microscopia de luz, a comparação da decidualização que ocorreu nos dias 5 e 7 da gestação e pseudogestação na região antimesometrial. Os resultados de decídua e decíduoma foram resultados muito semelhantes, ou seja, em cortes corados com HE percebeu-se nitidamente a formação tanto na decídua quanto no decíduoma das três regiões diferenciadas.

Entretanto, ao compararmos nossos resultados do dia 5 da pseudogestação com aqueles obtidos por Andrade (1993), verificamos que o desenvolvimento da camada de células decidualizadas subjacente ao epitélio foi mais exuberante, com características mais próximas às do dia 6 de pseudogestação descrito pela autora. Acreditamos que essa diferença possa ser explicada por dois fatores: 1) como con-

seqüência do tipo de óleo utilizado para induzir a decidualização, uma vez que a autora utilizou em seus experimentos óleo de arachis, enquanto que, neste trabalho, utilizamos óleo de amêndoa; 2) em decorrência da disposição do óleo no lúmen uterino.

Ao buscarmos informações na literatura que fornecessem suporte para estas conclusões, verificamos que, de fato, podem ocorrer variações no grau de resposta decidual em decorrência do tipo de agente indutor da decidualização. Finn e Keen (1963) testaram diferentes substâncias para induzir a decidualização. Os autores compararam diferentes tipos de indutores - óleo de oliva, óleo de arachis, parafina líquida e solução salina - e obtiveram diferentes respostas decidualizantes. Dentre elas, a mais exuberante foi a decidualização desenvolvida ao óleo de oliva, seguida pelo óleo de arachis. Andrade (1993), por sua vez, observou que havia grande diferença de resposta decidual de acordo com a disposição do óleo na luz luminal. Assim, quando o óleo preenchia completamente a luz uterina, havia grande modificação na morfologia do estroma – decidualização-. Entretanto, quando o óleo se apresentava fragmentado em gotas distribuídas na luz da cripta uterina, a reação decidual era menos evidente. O conjunto destas informações nos sugerem a possibilidade de que a resposta decidual esteja efetivamente relacionada com o tempo em que a substância indutora - óleo- possa permanecer em contato com o lúmen uterino.

Uma outra característica importante do processo de implantação e consequente decidualização é o aumento expressivo da permeabilidade vascular e da microvascularização sangüínea no endométrio decidualizado, particularmente no deciduoma. Essas alterações foram relatadas por Andrade (1993) e confirmadas em nossos resultados. Ao compararmos o endométrio não-grávido com o endométrio decidualizado, seja do animal grávido como do pseudográvido, observamos um

grande aumento da microvascularização, caracterizado pela presença de capilares e vênulas pós-capilares entre as células decíduais. O aumento da permeabilidade vascular endometrial em várias espécies de roedores sugere que esse fato tenha grande importância para que a reação decidual se estabeleça. Ainda dentro desse ponto, devemos mencionar que diversas descrições já foram relatadas acerca da histologia da decídua de roedores - especialmente de ratas -, além de vários estudos subsequentes da estrutura da decídua ao nível de microscopia eletrônica (Enders e Schlafke, 1967; Welsh e Enders, 1985), hamster (Blankenship et al., 1995) e de camundongos (Abrahamsohn, 1983; Greca, 1996; Greca et al., 1998). Todos os autores apontam o aumento da permeabilidade vascular como um fator decisivo para o sucesso da implantação. O aumento da permeabilidade vascular promove um edema visível no estroma subepitelial, próximo aos sítios de implantação, abrindo espaços para que ocorra proliferação celular (Psychoyos, 1961; Abrahamsohn, 1983; Abrahamsohn e Zorn, 1993; Greca, 1996; Greca et al., 1998). Os resultados obtidos por Greca (1996) em cortes de decídua de camundongos incubados com hialuronidase e corados com tricloreto hexamina de rutênio e azul cuprolínico sugerem que o edema se estabelece pela expressão maciça de ácido hialurônico e glicosaminoglicana condroitin-sulfato. Ambas as moléculas atuam de forma a reter água no tecido, o que permitiria tanto a proliferação dos fibroblastos quanto sua transformação em células decíduais. Como se pode constatar, esse evento é considerado um pré-requisito para que ocorra a transformação decidual das células do estroma (Lundkvist, 1978).

Já o aumento da microvascularização é fundamental para o estabelecimento da gestação, uma vez que uma das funções da decídua é nutrir o concepto em implantação (Hoffman, 1993). Acreditamos e concordamos com a sugestão proposta por Andrade (1993) de que a acentuada quantidade de capilares e vênulas

observada no decíduoma em relação à decídua se deva ao fato de que o estímulo decidualizante disparado pelo óleo de amêndoa seja mais intenso do que o estímulo desencadeado naturalmente pelo blastocisto.

5.2 DISTRIBUIÇÃO DE LAMININA

Já está bem estabelecido que os fibroblastos endometriais são as principais células responsáveis pela síntese da matriz extracelular (MEC) do endométrio. Além de colágeno e proteoglicanas, vários autores relataram a presença de glicoproteínas adesivas - tais como laminina e fibronectina - no endométrio de roedores (Grinnell et al., 1982; Glasser et al., 1987; Wewer et al., 1986; Babiarz et al., 1996) e em outras espécies de mamíferos incluindo os seres humanos (Wewer et al., 1985; Kusalus et al., 1987). Segundo estes autores - e também com base em nossos resultados - podemos inferir que as células diferenciadas dos fibroblastos - as células deciduais - continuam a expressar não somente as mesmas moléculas, como também passam a expressar novas proteínas de MEC, tais como colágeno tipo V (Teodoro, 1995).

Segundo Wewer et al. (1985), o endométrio humano não-decidualizado está ausente de laminina e colágeno tipo IV. Em nossos resultados observamos que o endométrio não-grávido de camundongos em estro apresentou uma marcação muito discreta de laminina, denotando uma pequena quantidade da referida glicoproteína em todo o estroma uterino. Apenas as túnicas musculares do miométrio apresentaram marcação. Por outro lado, o endométrio decidualizado - decídua e decíduoma - apresentou imunoreatividade bem mais expressiva. A presença de laminina no endométrio decidualizado foi ponto de observação de Iwahshi et al. (1996). Os autores relataram a presença de moléculas de lâmina basal, como a laminina, presentes ao redor das células decidualizadas do endométrio humano.

Nos dias 5 e 7 da gestação e pseudogestação, os resultados são muito semelhantes, ou seja, há um aumento expressivo da presença de laminina, sobretudo na região de células pré-decíduais que estão em franco processo de transformação. Na região de células decíduais maduras do dia 5, observou-se grande positividade de laminina intracelular, sugerindo uma intensa síntese da mesma pelas células decíduais. No decíduoma esse resultado foi muito semelhante. Como todos os cortes de decíduoma foram tratados com solução de tripsina a 0,01%, foi possível evidenciar melhor a referida glicoproteína, uma vez que a digestão propicia um melhor acesso do anticorpo ao antígeno. Os cortes de endométrio no dia 7 da gestação e pseudogestação apresentaram um padrão de distribuição semelhante ao do dia 5, ou seja, maior concentração da glicoproteína no citoplasma das células pré-decíduais. Entretanto, análises mais atentas das células maduras indicaram a presença de laminina na superfície celular. Nos cortes de decíduoma tratados com tripsina era evidente a presença da molécula tanto na superfície como intracelular.

Corroborando com nossos resultados que revelam inequívoca presença de laminina e fibronectina nos primeiros dias da implantação, Loke et al. (1995) relataram que, durante o primeiro trimestre da gravidez humana, as referidas proteínas são particularmente abundantes no útero, estando distribuídas ao redor de cada célula decidual. Thomas e Dziadek (1993) demonstraram que o gene para laminina é expressado na decídua durante o período de pré-implantação.

Aplin et al. (1988) e Aplin (1989) sugeriram que, durante a gravidez humana, as células decíduais passam a produzir uma lâmina basal pericelular constituída por colágeno IV, laminina e proteoglicana heparan sulfato. As funções da laminina no endométrio decidualizado não estão totalmente conhecidas, mas é possível que atuem no controle de adesão, migração, diferenciação e invasão das células trofoblásticas, portanto, na implantação do blastocisto. Em decorrência da importante

remodelação da matriz extracelular (MEC) que ocorre durante a decidualização, a expressão de novas moléculas da MEC pelas células deciduais, como a laminina, seria mais uma contribuição do organismo materno ao sucesso da invasão do trofoblasto. Como a laminina também é expressada pelas células deciduais do deciduoma, concluímos que a produção dessa proteína é um fenômeno intrínseco do organismo materno.

Para reforçar esta conclusão, algumas evidências indiretas inferem que a laminina se constitui numa das glicoproteínas indispensáveis para o sucesso da implantação. Determinadas condições patológicas, como o crescimento retardado do embrião e pré-eclâmpsia, resultam em uma invasão insuficiente do trofoblasto na decídua materna (Zhou, 1993). Um estudo desenvolvido por Bilalis et al. (1996) em endométrio humano obtido de biópsias de mulheres normais e inférteis, detectou que o endométrio de mulheres normais apresentava colágeno tipo IV, fibronectina e laminina no estroma e na lâmina basal das glândulas e vasos sangüíneos. Entretanto, estas mesmas moléculas estavam ausentes no endométrio das mulheres inférteis, indicando um distúrbio na distribuição das glicoproteínas. Segundo os autores, a conseqüência desse defeito foi percebida pela falha total da implantação do blastocisto nas mulheres inférteis.

Outros autores têm destacado a importância da presença da laminina no endométrio decidualizado, sugerindo que a molécula poderia ser utilizada como substrato para a migração celular, desde que a célula expresse receptores de superfície apropriados. Segundo Shim et al. (1997), a transformação do endométrio não grávido em decídua é acompanhada por várias alterações nos componentes da matriz extracelular e pela expressão de receptores de matriz apropriados pelas células. Em muitos sistemas biológicos, as células requerem um substrato de proteínas de matriz extracelular para ancorar e utilizar como tração para a migração (Turner,

1992). A invasão do tecido hospedeiro por células cancerígenas, por exemplo, é dependente da interação específica dos receptores de superfície da célula tumoral com a matriz extracelular ou componentes da membrana basal como a laminina (Ruoslahti, 1996).

A adesão das células à matriz extracelular é mediada por receptores de superfície específicos, pertencentes principalmente à família das integrinas, que são complexos glicoprotéicos inseridos na membrana plasmática. Muitas integrinas reconhecem uma seqüência específica de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico presentes em grande número de proteínas da matriz extracelular tais como laminina, fibronectina, colágeno tipo I e vitronectina. A adesão celular para laminina envolve principalmente o heterodímero $\alpha6\beta1$ e o heterodímero $\alpha6\beta4$ localizados nos hemidesossomos, sendo que esses têm papel importante na ligação da laminina a algumas células (Lee et al., 1992). Segundo Loke et al. (1995), as células do trofoblasto expressam receptores para laminina e fibronectina, indicando que a adesão dessas células às diferentes proteínas da matriz extracelular pode ser importante na transformação das células do trofoblasto de um fenótipo sésil para um móvel. Reforçando mais ainda a importância da laminina no endométrio decidualizado, Romagnano e Babiarz (1993) relataram que proteínas de matriz extracelular - como colágeno, laminina e fibronectina - promovem, *in vitro*, a adesão e a invasão do blastocisto de camundongo. Também já são conhecidas as propriedades de adesão das mesmas para a laminina e fibronectina em células trofoblásticas humanas (Fisher et al., 1989; Burrows et al., 1993).

Durante o processo de implantação, as células trofoblásticas ligam-se à laminina e fibronectina da matriz secretadas por células do estroma decidual, sendo que esta interação é mediada por uma combinação de moléculas de integrinas funcionalmente ativas. Dessa forma, as células trofoblásticas são tracionadas e migram

através da decídua. Nesse sentido, a regulação destas interações adesivas e subsequente migração é crucial para o sucesso da implantação (Loke et al., 1995).

Shim et al. (1997), utilizando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR), estudaram a regulação da expressão das cadeias de laminina em camundongos durante o período de pré-implantação. Concluíram que, em grande variedade de células, a expressão de diferentes cadeias de laminina - e subunidades da mesma - pode estar envolvida nos mecanismos de modulação de sua atividade biológica. Os autores também sugerem que esta expressão gênica no útero de camundongos fêmeas grávidas é dependente do estímulo hormonal - estrógeno -.

Com base nestas informações, sugerimos que na decidualização a laminina desempenha pelo menos dois importantes papéis: 1) está diretamente envolvida no processo de adesão e invasão do trofoblasto; 2) é fundamental para o processo de transformação decidual.

5.3 DISTRIBUIÇÃO DE FIBRONECTINA

Numa situação totalmente oposta aos resultados descritos para laminina, a coloração imunocitoquímica para fibronectina revelou grande quantidade da mesma em todo o estroma endometrial dos animais não-grávidos. Distribuição semelhante também foi observada por Grinnell et al. (1982) no estroma endometrial de ratas em período estro. Os mesmos autores também demonstraram, por imunofluorescência, que a fibronectina estava presente na lâmina basal das células epiteliais luminárias. Vollmer et al. (1990) vão mais além, indicando que o estroma endometrial não-decidualizado contém classicamente as glicoproteínas: colágeno I, II, V e VI, fibronectina e depósitos periglandulares de tenascina.

As análises dos cortes incubados para detecção de fibronectina da decídua e deciduoma dos dias 5 e 7 da gestação e pseudogestação mostram que, dife-

rentemente do observado na distribuição da laminina - onde a maior concentração da glicoproteína se dava na região pré-decidual -, a concentração de fibronectina, ocorreu na região de células não-decidualizadas, com marcante redução na região pré-decidual e mesmo ausência de positividade na região de células deciduais maduras.

Uma possível explicação para esse padrão de distribuição pode ser feita se correlacionarmos a maior quantidade de MEC em estromas não-decidualizados com aquela de estroma decidualizado. A tênue - e por vezes escassa - marcação para a glicoproteína entre as células deciduais maduras pode ser explicada pela quase total ausência de espaços intercelulares. Mesmo assim, quando em cortes favoráveis, a fibronectina foi evidenciada nos diminutos espaços intercelulares que circundam as células deciduais maduras. Como será visto a seguir, há suporte da literatura para esta conclusão.

Segundo Grinell et al. (1982), existe uma estreita correlação entre a transformação da forma do fibroblasto no processo de decidualização e a distribuição de fibronectina *in vivo*. Segundo os autores, durante a decidualização, enquanto os fibroblastos se transformam em células arredondadas, a fibronectina é redistribuída na matriz extracelular até desaparecer, permanecendo ao redor dos vasos sanguíneos, onde mantém-se constante. Em vista desses dados, os autores sugerem que o desaparecimento da fibronectina da superfície dos fibroblastos está relacionado com a transformação decidual dos mesmos. A presença da fibronectina no estroma decidualizado pode ter relação com a presença de determinados tipos de moléculas da MEC. Sendo o estroma uterino rico em colágeno tipo III, a fibronectina pode estar envolvida na adesão dos fibroblastos do estroma a esse colágeno. Segundo relatos de Babiarz et al. (1996), carência de fibronectina resulta na perda dos prolongamentos e arredondamento das células, uma vez que as interações de ade-

sividade são rompidas.

A drástica redução da marcação para a fibronectina nas regiões de células maduras observada em nossos cortes vai de encontro às observações descritas por Grinnell et al. (1982) em endométrio de ratas, que apontaram um decréscimo de fibronectina na região decidual proximal, subjacente ao trofoblasto invasivo. Como a fibronectina é uma proteína comprovadamente necessária para mecanismos de movimentação celular, a ausência de fibronectina na matriz extracelular poderia constituir-se num dos fatores que participariam, juntamente com as junções intercelulares, da barreira estabelecida pela decídua para conter e controlar a invasão do trofoblasto (Babiarz et al., 1996).

Kisalus et al. (1987), em estudo imunocitoquímico da decídua humana no primeiro trimestre de gravidez, encontraram abundante quantidade de fibronectina na matriz extracelular de células deciduais. Eles concluíram que, se o papel da decídua é prover um suporte para a implantação do conceito, a fibronectina pode estar presente para auxiliar na adesão das células aos componentes da matriz extracelular que suportará o crescimento do embrião.

Apesar da ausência de relatos na literatura concernentes à presença de fibronectina em decidualização artificialmente induzida, com relação ao deciduoma, vale sugerir mais uma vez que, tal como sugerido para a laminina, o controle e coordenação da expressão de fibronectina é um mecanismo intrínseco ao organismo materno, uma vez que o padrão de distribuição da glicoproteína nos cortes analisados neste estudo comparativo entre decídua e deciduoma é muito semelhante.

6 CONCLUSÕES

Após a análise e discussão dos resultados pode-se concluir que:

6.1- A decidualização do endométrio pode ser desencadeada não só através do contato do blastocisto com o epitélio uterino mas também por um estímulo artificial no epitélio como, por exemplo, através da injeção de óleo de amêndoa. O estímulo dado pelo óleo de amêndoa é mais exuberante que o de arachis.

6.2- O processo de decidualização na região antimesometrial ocorre de forma muito semelhante na decídua e no deciduoma, com formação das camadas de células decidualizadas, pré-decidualizadas e não decidualizadas.

6.3- As glicoproteínas laminina e fibronectina são componentes da matriz extracelular do endométrio, apresentando papel importante na reorganização da matriz extracelular durante a decidualização e também atuam no controle da adesão, migração e invasão das células trofoblásticas.

6.4- Com relação à distribuição de laminina, conclui-se que a mesma está ausente no endométrio nulíparo e aumenta nos dias 5 e 7 de gestação e pseudo-gestação, com maior concentração na região de células pré-decidualizadas. Esse aumento na produção de laminina é um fator inerente ao ambiente materno, indicando a necessidade das células na produção de uma molécula que será vital para o processo de implantação do trofoblasto.

6.5- No que diz respeito à distribuição de fibronectina, pode-se concluir

que a mesma está presente em grande quantidade no endométrio nulíparo, enquanto que, a partir da decidualização, ocorre uma redução da mesma. A quase total ausência de fibronectina na camada de células deciduais maduras constitui um fator importante na contenção da invasão das células trofoblásticas do embrião.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, 166: 263-274, 1983.
- 2 ABRAHAMSOHN, P. A. Morphology of the Decidua. In: Yoshinaga, K. **Blastocyst Implantation**. Boston: Adams Publishing Group, 1989. p.127-133.
- 3 ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, 1993.
- 4 ABRAHAMSOHN, P. A. et al. Extracellular matrix of the mouse endometrium during decidualization. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86: 23-25, 1991.
- 5 ALBERTO-RINCON, M.C. et al. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. **Am. J. Anat.**, 186: 417-429, 1989.
- 6 ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1.294p.
- 7 ANDRADE, C.G.T.J. **Decidualização induzida de camundongas pseudográvidas**. Estudo morfológico ultraestrutural. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado em Ciências, Histologia) - Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 8 ANDRADE, C. G. T. J. et al. Death and replacement of uterine epithelial cells during oil-induced deciduoma development in the mouse. **Anat. Rec.**, 244:316-26, 1996.
- 9 APLIN, J. D. et al. An immunohistochemical study of human extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. **Cell Tissue Res**, 253: 231-240, 1988.
- 10 APLIN, J.D. Cellular biochemistry of the endometrium. In: Wynn R.M. (Eds). **Biology of the uterus**. New York: Plehum Medical, 89-129, 1989.
- 11 BABIARZ, B. et al. Localization and expression of fibronectin during mouse decidualization *in vitro*: mechanisms of cell: matrix interactions. **Devel. Dynamics**, 206:330-342, 1996.
- 12 BIEGLMAYER, C. et al. Laminin in pregnancy. **Gynecol. Obstet. Invest**, 22: 7-11, 1986.
- 13 BILALIS, D. A. et al. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. **Hum. Reprod**, 11: 2.713-2.718, 1996.
- 14 BIJOVSKY, T. et al. Remodelling of mouse endometrial stroma during the preimplantation period. **Acta Anat**, 144: 231-234, 1992.

- 15 BLANKENSHIP, T. N.; GIVEN, R. L. Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. **Anat. Record**, 243: 27-36, 1995.
- 16 BROKELMAN, J.; BIGGES, J. Studies on the development of cell contacts and of intercellular matrix during decidualization in the rat. **Arch. Gynecol.**, 227: 103-117, 1979.
- 17 BURROWS, T. D. et al. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to lamin or fibronectin. **Hum. Reprod.**, 8(3): 475-484, mar. 1993.
- 18 CARSON, D. C. et al. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. **Dev. Biol.**, 120: 228-235, 1987.
- 19 CARVALHO, J. J. **Incorporação de sulfato de sódio radioativo por células do endométrio de camundongas durante o período inicial de gestação.** São Paulo: 1989. 85p. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 20 CHARPIN, C. et al. Laminin distribution in human decidua and immature placenta an immunoelectron microscope study (avidin-biotin-peroxidase complex method). **Am. J. Obst. Gynecol.**, 151: 922-927, 1985.
- 21 COONS, A. H. et al. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 47: 200-202, 1941.
- 22 COWELL, T. P. Implantation and development of the mouse eggs transferred to the uteri of non-progestational mice. **J. Reprod. Fertil.**, 19:239-245, 1969.
- 23 DE FEO, V. J. Decidualization. In: WYNN, R.M. (Ed). **Cellular Biology of the Uterus.** Amsterdam: North Holland, 1967. p.192-291.
- 24 DUTT, A. et al. Regulation of n-linked glycoprotein assembly in uteri steroid hormones. **Endocrinology**, 118: 661-673, 1986.
- 25 ENDERS, A.C.; SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. **Am. J. Anat.**, 12: 185-226, 1967.
- 26 FAINSTAT, T. Extracellular studies of uterus. Disappearance of discrete collagen bundles in endometrial stroma during various reproductive states in the rat. **Am. J. Anat.**, 112: 337-369, 1963.
- 27 FINN, C.A.; KEEN, P. M. The induction of deciduomata in the rat. **J. Embryol. Exp. Morph.**, 11: 673-682, 1963.
- 28 FINN, C.A.; MCLAREN, A. A study of the early stages of implantation in mice. **L. Reprod. Fert.**, 13: 259-267, 1967.
- 29 FINN, C. A. The biology of decidual cells. **Adv. Reprod. Physiol.**, 5: 1-26, 1971.
- 30 FINN, A.C. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. (Ed). **Biology of the Uterus.** New York: Plenum Press, 1977. p. 245-308.
- 31 FISHER et al. 1989. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro*. **J. Cell. Biol.** 109: 891-902, 1989.

- 32 FLEMING, S.; BELL, S.C. Localization of fibrillin-1 in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and pregnancy. **Hum. Reprod.**, 12 (9): 2.051-2.056, 1997.
- 33 GLASSER, S.R.; JULIAN, J.A. Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. **Biol. Reprod.**, 35: 463-76, 1986.
- 34 GLASSER, S. R. et al. Expression of desmin, laminin and fibronectin during *in situ* differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. **Differentiation**, 35:132-142, 1987.
- 35 GOROSPE, W. G.; FREEMAN, M.E. The effects of various methods of cervical stimulation on continuation of prolactin surges in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 167: 78-82, 1981.
- 36 GRECA, C. P. S. **Estudo citoquímico ultra-estrutural associado a tratamento enzimático da matriz extracelular fundamental do endométrio de camundongos**. São Paulo, 1996. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 37 GRECA, C. P. S. et al. Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes. **Tissue & Cell**, 30 (3): 304-311, 1998.
- 38 GRINELL, F. et al. Fibronectin and cell shape *in vivo*: Studies on the endometrium during pregnancy. **J. Cell. Biol.**, 94: 597-606, 1982.
- 39 GROSSKINSKY, C. M. et al. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells *in vitro*. **JCE & Metabol**, 81(6): 2.047-2.054, 1996.
- 40 GUILLOMOT, M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. **Placenta**, 20: 399-345, 1999.
- 41 HAY, E. D. **Cell biology of extracellular matrix**. New York: Plenum Press, 1991.
- 42 HARKNESS, M.L.R.; HARKNESS, R.D. The collagen of the content of the reproductive tract of rats the during pregnancy and lactation. London: **J.Physiol.**, 123: 492-500, 1954.
- 43 HARKNESS, M.L.R.; HARKNESS, R.D. The distribution and growth of collagen in the uterus of the pregnant rat. London: **J. Physiol.**, 132: 492-501, 1956.
- 44 HYNES, R.O. Fibronectins. **SCI. AM.**, 254: 42-51, 1986.
- 45 HOFFMAN, L. H.; WOODING, F. B. P. Giant and binuclear trophoblast cells of mammals. **J. Exp. Zool.**, 266:559-577, 1993.
- 46 IWAHASHI M. et al. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **J. Reprod.Fert.**, 108(1): 147-155, 1996.
- 47 JOLLIE, W.P.; BENCOSME, S.A. Electron microscopic observation on primary decidua formation in the rat. **Am. J. Anat.**, 116: 216-236, 1965.
- 48 KIRBY, D.R.S; COWELL, T. P. Trophoblast mesenchymal interactions. In: Fleischmajer R.; Billingham, R. E. **Epithelial-mesenchymal interactions**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1968. p. 64-77.

- 49 KISALUS, L. L. et al. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first-trimester human decidua. **Anat. Rec.**, 218(4): 402-15, 1987.
- 50 KISALUS, L. L.; KERR, J. C. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycan in human decidual cell secretory bodies and placental fibrinoid. **Biol. Reprod.**, 39: 419-430, 1988.
- 51 KREHBIEL, R.H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during pregnancy and in the production of deciduomata. **Physiol.Zool.**, 10: 212-38, 1937.
- 52 KORHONEN, M.; VIRTANEN, I. The distribution of laminin and fibronectin is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. **J. Histochem. Cytochem.**, 45(4): 569-581, 1997.
- 53 LEA, R. G.; CLARK, D. A. Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. *Bailliere's Clin. Obstet. Gynaecol.*, 5: 25-59, 1991.
- 54 LEE, E. C. The integrin $\alpha 6\beta 4$ is a laminin receptor. **J. Cell. Biol.**, 117: 671-678, 1992.
- 55 LEJEUNE, B. et al. Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. **J. Reprod. Fertil.**, 61: 235-40, 1981.
- 56 LINO DA COSTA, G. F. L. **Migração de leucócitos em endométrio decidualizado de ratas pseudoprenhes.** São Paulo, 1991, 89p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1991.
- 57 LOBEL, B. L. et al. Studies on the mechanisms of nidation. XVII Histochemical analysis of decidualization in the rat. **Acta. Endocr.**, 50: 469-85, 1965.
- 58 LOBEL, B. L. et al. Studies on the mechanisms of nidation. XXXIV Dynamics of cellular interaction during progestation and implantation in the rat. **Acta. Endocr.**, 56 (123): 7-109, 1967.
- 59 LOEB, L. The production of deciduomata and the relation between the ovaries and formation of decidua. **L. Amer. Med. Ass.**, 50:1897-901, 1908.
- 60 LOKE, Y. W. et al. Decidua in human implantation. **Hum. Reprod.**, 10(2): 14-21, 1995.
- 61 LUNDKVIST, O. Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. **Biol. Reprod.**, 18: 306-316, 1978.
- 62 MAO, S. Y. et al. Overview of antibody use in immunocytochemistry. In: JAVOIS, Lorette. **Immunocytochemical methods and protocols.** Methods in molecular biology. New Jersey: Human Press, 1994.
- 63 MARTELLO, E. M. V. G.; ABRAHAMSOHN, P. A. Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. **Acta Anat.**, 127: 146-150, 1986.
- 64 MARTIN, L.; FINN, C. A. hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. **J. Endocrinol.**, 41: 363-371, 1968.

- 65 MONTFORT, I. et al. Studies on uterine collagen during pregnancy and puerperium. **Lab. Invest.**, 10: 1240-1258, 1961.
- 66 MONICE, F.L. **Involução do decíduoma induzido em camundongos pseudo-grávidos.** Estudo estrutural, ultraestrutura e imunocitoquímico. São Paulo, 1998. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 67 MOSSMAN, H.W. **Vertebrate fetal membranes.** New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. 383 pp.
- 68 O'SHEA, J. et al. Ultrastructure of decidualization in the pseudopregnant rat. **Am. J. Anat.**, 166: 271-298, 1983.
- 69 OLIVEIRA, S. F. et al. Electron microscopic radioautographic study on the incorporation of ³H-proline by mouse decidual cells. **Cell. Molec. Biol.**, 37: 315-323, 1991.
- 70 OLIVEIRA, S.F et al. Organization of desmin-containing intermediate filament during differentiation of mouse decidual cells. **Histochemistry and Cell Biology**, 113(4): 319-327, abril 2000.
- 71 ONO, H. et al. Electron microscopic study on early decidualization of the endometrium of pregnant mice, with special reference to gap junctions. **Placenta**, 10: 247-261, 1989.
- 72 PSYCHOYOS, A. Perméabilité capillaire et décidualisation utérine. **C. R. Acad. Sci.**, 252: 1515-17, 1961.
- 73 RIDER, V. et al. Uterine fibronectin mRNA content and localization are modulated during implantation. **Dev. Dyn.**, 195:1-14,1992.
- 74 ROMAGNANO, L. et al. An *in vitro* system for the study of matrix metalloproteases during decidualization in the mouse. **Biochem. Cell. Biol.** 74: 911-919. 1996.
- 75 RUOSLAHTI, E. Integrin signaling and matrix assembly. **Tumor Biol.**, 17: 117-124, 1996.
- 76 SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biol. Reprod.**, 12: 41-65, 1975.
- 77 SHIM, C.; CHOI, D. et al. Expression of laminin chain-specific gene transcripts in mouse uterine tissues during peri-implantation period. **Mol. Repr. Dev.**, 48: 176-184, 1997.
- 78 SOARES GRECA, C. P. S. et al. Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglycans in the endometrium of mice. **An. Rec.**, 259, 2000. No prelo.
- 79 TEODORO, W. P. R. **Quantificação e caracterização bioquímica e imunológica do colágeno no endométrio de camundongas virgens e grávidas.** São Paulo, 1995. 104p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

- 80 THOMAS, T.; DZIADEK, M. Expression of laminin and nidogen genes during the postimplantation development of the mouse placenta. **Biol. Repr.**, 49, 1251-1259, 1993.
- 81 TOOLE, B.P. Glycosaminoglycans in Morphogenesis. In: HAY, E.D. **Cell Biology of Extracellular Matrix**. New York: Plenum, 1981. p. 259-294.
- 82 TURNER, M. L. Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology. **Biol. Ver.**, 67: 359-377, 1992.
- 83 VOLLMER et al. Tenascin expression in the human endometrium and in endometrium adenocarcinomas. **Lab. Invest.**, 62: 725-730. 1990.
- 84 WARTIOVAARA, J. et al. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. **Dev. Biol.**, 69: 247-257, 1979.
- 85 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. **Am. J. Anat.**, 172: 1-29, 1985.
- 86 WEWER, U. M. et al. Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells. **Lab. Invest.**, 53: 624-633, 1985.
- 87 WEWER, U. M. et al. Mouse endometrial stroma cells produce basement-membrane components. **Differentiation**, 32: 40-58, 1986.
- 88 ZHOU, Y. et al. Pre-eclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules in invasive cytotrophoblasts. **J. Clin. Invest.**, 91: 950-960, 1993.
- 89 ZORN, T.M.T. Synthesis of proteins of the extracellular matrix with special reference to the mouse decidua, as studied by radioautography. In: WEGMANN, R.J.; WEGMANN, M. A. (Eds). **Recent advances in cellular and molecular biology from 1st world congress of cellular molecular biology**. Leuven: Pecters Press, 1992. p.103-107.
- 90 ZORN, T.M.T. et al. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. **Cell Tissue Res.**, 244: 443-448, 1986.
- 91 ZORN, T. M. T. et al. Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells. **Anat. Rec.**, 225: 96-100, 1989.
- 92 ZORN, T. M. T. et al. Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidual cells. **J. Struct. Biol.**, 103: 23-33, 1990.
- 93 ZORN, T. M. T.; PINHAL, M. A. S.; CARVALHO, J. J.; ABRAHAMSOHN, P. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C.P. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. **Cellular and Molecular Biology.**, 41 (1): 97-106, 1995.