RENATO DE MAYRINCK SALGADO

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEOGLICANOS DO ÚTERO DE
CAMUNDONGOS DURANTE O CICLO ESTRAL E EM ANIMAIS
OVARECTOMIZADOS: ANÁLISE DOS EFEITOS DA CASTRAÇÃO E DA
REPOSIÇÃO HORMONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a Dr^a Telma Maria Tenório Zorn

São Paulo

2009

RESUMO

Salgado RM. Caracterização de proteoglicanos do útero de camundongos durante o ciclo estral e em animais ovariectomizados: análise dos efeitos da castração e da reposição hormonal [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Estudos clássicos mostraram que a ausência induzida de estrógeno e progesterona impede a decidualização e a implantação do blastocisto. Dados mais recentes mostraram que a gestação promove uma intensa remodelação de várias moléculas da matriz extracelular (MEC) no estroma endometrial. Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência dos hormônios ovarianos estrógeno (E2) e progesterona (P4) sobre a estrutura e ultra-estrutura dos tecidos uterinos e sobre a deposição dos proteoglicanos decorin, biglican, fibromodulin, lumican, perlecan e versican nos tecidos uterinos de camundongos. Adicionalmente, analisamos a expressão do RNAm do versican e suas isoformas. Para isto, utilizamos um modelo de castração cirúrgica e posterior reposição hormonal como principal estratégia experimental e o ciclo estral, como parâmetro para o perfil hormonal dos animais. Verificamos que durante o ciclo estral ocorre intensa remodelação na estrutura dos tecidos uterinos e que esta é dependente do hormônio dominante. Dois compartimentos morfofuncionalmente distintos foram identificados no estroma endometrial, denominados superficial e profundo. A imunohistoquímica mostrou que a resposta aos hormônios ovarianos é: (i) compartimento-específica; (ii) hormônio-específica e; (iii) molécula-específica. Similar modulação foi observada nas camadas do miométrio, onde todas as moléculas estudadas, exceto o perlecan, foram abolidas após a ovariectomia. Particularmente notável foi a modulação do versican pelos hormônios ovarianos: P4 induz a deposição de versican no estroma, enquanto o miométrio responde apenas a E2. Devido à heterogeneidade das populações celulares nos tecidos uterinos e pela complexa ação hormonal que envolve síntese, deposição e degradação do versican, não houve correlação direta entre a expressão do RNAm e a deposição da proteína. Das quatro isoformas do versican, V0, V1 e V3 estão presentes no útero de camundongos. A modulação destes proteoglicanos pelos hormônios ovarianos sugere fortemente a relevância destas moléculas da MEC para a composição de um ambiente uterino propício para implantar e desenvolver o embrião.

Palavras-chave: Endométrio; Miométrio; Hormônios esteróides ovarianos; Proteoglicanos; Ciclo estral; Reposição hormonal.

ABSTRACT

Salgado RM. Characterization of proteoglycans in the mouse uterus during the estrous cycle and in ovariectomized animals: analysis of the effects of castration and hormone replacement [Thesis]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo; 2009.

Previous studies demonstrated that the induced absence of estrogen and progesterone blocks the processes of decidualization and blastocyst implantation. Recent data showed that pregnancy promotes an intense remodeling of many extracellular matrix (ECM) molecules in the endometrial stroma. The objective of the present study was to evaluate the influence of the ovarian hormones estrogen (E2) and progesterone (P4) on the structure and ultra-structure of the uterine tissues and on the deposition of the proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin, lumican, perlecan and versican in mouse uterine tissues. Additionally, we analyzed the expression of versican mRNA and its isoforms. For that, we developed a new model of ovariectomy and hormone replacement as main strategy. The estrous cycle was used as physiological parameter to study hormone-dependent processes. We verified that during the estrous cycle a conspicuous remodeling of the uterine tissues occurs, orchestrated by E2 and/or P4. Two morphophysiologically distinct compartments were identified in the endometrial stroma, denoted as superficial and deep. The immunohistochemical analysis showed that the response to the ovarian hormones is: (i) hormone-; (ii) compartment- and (iii) tissue-specific. Similar modulation was observed in both muscle layers of the myometrium, where all molecules, except perlecan, were abolished after ovariectomy. Particularly noteworthy was the modulation of versican by the ovarian hormones: P4 induces the deposition of versican in the stroma, whereas the myometrium responds only to E2. Possibly due to the heterogeneity of the cell populations in the uterine tissues and to the complex hormone actions that involves synthesis, deposition and degradation of versican, there was no direct correlation between the expression of its mRNA and the protein deposition in the ECM. Moreover, only V0, V1 and V3 isoforms are present in the mouse uterus. The intricate modulation of these proteoglycans by the ovarian hormones strongly suggests the relevance of these ECM molecules to promote a receptive uterine microenvironment for embryo implantation and development.

Key words: Endometrium; Myometrium; Ovarian steroid hormones; Proteoglycans; Estrous cycle; Hormone replacement.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O Aparelho Reprodutor Feminino

O aparelho reprodutor feminino da maioria dos mamíferos, incluindo os roedores, é formado pelos ovários, ovidutos, útero, vagina, glândulas anexas e clitóris (Rugh, 1968).

Os **ovários** são as gônadas femininas e funcionalmente podem ser caracterizados como glândulas mistas, pois sintetizam hormônios (função endócrina) e secretam o ovócito para o meio (função exócrina). Nos roedores, os ovários se localizam lateralmente aos rins e se conectam à parede dorsal da cavidade abdominal por uma projeção do peritônio denominada mesovário. Histologicamente, a superfície externa do ovário é recoberta por um epitélio cúbico simples, o epitélio germinativo. Abaixo deste há uma camada de tecido conjuntivo denso, denominado túnica albugínea. O estroma é dividido em região cortical, abaixo da túnica albugínea, e região medular, formada por tecido fibroso, por onde circulam vasos e nervos. Na região cortical localizam-se os folículos ovarianos, que consistem em um ovócito (célula germinativa feminina) envolvido por uma ou mais camadas de células foliculares ou granulosas, dependendo do seu estágio de desenvolvimento (Rugh, 1968; Junqueira e Carneiro, 2008).

Figura 1. Desenho esquemático do ovário e seus folículos (Junqueira e Carneiro, 2008).

O **oviduto** é um tubo contorcido que se estende do espaço periovariano aos cornos uterinos, importante por transportar o ovócito proveniente do folículo ovariano

e o espermatozóide vindo da luz uterina. Portanto, o oviduto é o local onde ocorre a fertilização. As regiões que formam o oviduto são: o infundíbulo, a ampola, o istmo e a porção uterina.

O **útero** dos roedores é composto por dois cornos longos que se unem em um pequeno corpo uterino, formando uma cérvix única que se projeta na vagina. O útero está ligado à parede abdominal pelo mesométrio, um ligamento contendo vasos sanguíneos e nervos (Conti, 2001). A mucosa uterina, denominada endométrio, é constituída por um epitélio cilíndrico simples, formado por células secretoras não ciliadas e células ciliadas, o qual é sustentado por uma membrana basal, e pelo estroma. O estroma endometrial é um tecido conjuntivo frouxo, formado principalmente por fibroblastos endometriais e por uma rica matriz extracelular (MEC). As glândulas presentes no estroma são invaginações do epitélio de revestimento da luz uterina. O miométrio é composto por duas camadas musculares lisas, uma circular interna e uma longitudinal externa, as quais estão separadas por uma camada de tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado. Os cornos uterinos são revestidos externamente por uma serosa, o mesotélio (Rugh, 1968).

Figura 2. Corte transversal de útero de camundongo, evidenciando os diferentes tecidos que o compõem. L – luz uterina; E – endométrio; MI – camada interna do Miométrio; ME – camada externa do miométrio; seta – epitélio luminal; cabeça de seta – glândula endometrial. Coloração de HE.

A **vagina** é o órgão mais externo do aparelho reprodutor feminino e é achatada dorso-ventralmente nos roedores, sendo sua abertura exterior denominada vulva. A mucosa vaginal é formada por tecido conjuntivo fibroso e vascularizado, revestido por um epitélio estratificado pavimentoso. Este epitélio é constituído de células basais e intermediárias nucleadas, e células superficiais em diferentes estágios de queratinização.

Figura 3. Fotomicrografia de corte transversal de vagina, evidenciando o epitélio estratificado queratinizado e o tecido conjuntivo denso subjacente (Junqueira e Carneiro, 2008). Picrosirius.

1.2 O Ciclo Estral Dos Roedores

O organismo feminino maduro é tipicamente cíclico, sendo este mecanismo controlado por níveis precisos dos hormônios esteróides sexuais estrógeno (E2) e progesterona (P4), produzidos pelos ovários (Allen, 1927).

Com o início da maturidade sexual e sob a ação do hormônio folículo-estimulante (FSH) hipofisário, os folículos ovarianos quiescentes iniciam seu desenvolvimento através de modificações no ovócito, nas células da granulosa e nos fibroblastos que envolvem os folículos. Ou seja, o estroma em torno do folículo se modifica, formando duas camadas de células especializadas na produção de

hormônios esteróides, as tecas foliculares interna e externa. As células da teca interna e as células da granulosa sintetizam e secretam E2. Os altos níveis deste hormônio constituem o estímulo necessário para a liberação, pelos gonadotrofos da adenohipófise, do hormônio luteinizante (LH), o qual promove a ruptura do folículo maduro (ou de Graaf) e a liberação do ovócito na luz da tuba uterina. Ainda sob a ação do LH, o folículo de Graaf roto diferencia-se numa glândula endócrina temporária, o corpo lúteo, responsável pela síntese e secreção de P4.

O ciclo reprodutivo dos roedores, como o camundongo, é conhecido como **ciclo estral** e tem duração curta de 4 a 5 dias. Nestes animais poliestros, o ciclo estral, do mesmo modo que o ciclo menstrual de mulheres, é marcado por mudanças na estrutura dos órgãos genitais e dos tecidos uterinos. No ciclo estral, entretanto, são reconhecidas quatro fases com características morfológicas distintas, as quais podem ser identificadas pelas características do esfregaço vaginal, obtido através da técnica descrita por Shorr (1941), e pelas características morfológicas do útero (Allen, 1927; Rugh, 1968; Constanzo, 1999). As fases do ciclo estral são denominadas *proestro*, *estro*, *metaestro* e *diestro*.

Proestro

O proestro é uma fase preparatória ou construtiva, caracterizada pela proliferação dos fibroblastos do estroma endometrial, e por um considerável aumento em número de capilares sanguíneos do endométrio. Estas modificações são acompanhadas pelo crescimento dos folículos ovarianos, e são portanto consequência da secreção elevada de E2 e da síntese de P4 pelas células granulosas dos folículos. Em relação à genitália externa, os animais nesta fase apresentam o orifício vaginal aberto. No esfregaço vaginal são observadas células epiteliais basais e intermediárias. O núcleo destas células, por vezes, apresenta-se condensado caracterizando a picnose nuclear. O citoplasma é homogêneo e claro, e quando corado pelo corante de Shorr adquire tons verde-azulados. A duração deste período é por volta de 12 horas.

Estro

Assim como o proestro, o estro é um período anabólico, sendo esta a fase em que as fêmeas encontram-se receptivas ao macho. Nesta fase, os vasos sanguíneos uterinos e ovarianos são mais dilatados e mais evidentes que em proestro, e o útero encontra-se edemaciado e hipertrofiado. A maturação dos ovócitos e o crescimento folicular iniciados na fase anterior e, portanto, a consequente produção continuada de E2, promovem um pico de LH, responsável pela ruptura do folículo e liberação do ovócito. Característica marcante do animal em estro é o alto nível de E2 sérico. Como sinais externos, a vulva pode ainda se mostrar edemaciada, o orifício vaginal aberto e a mucosa apresenta pouca secreção. A análise citológica do esfregaço vaginal pela técnica de Shorr mostra apenas células anucleadas, isoladas ou em grumos, que se coram em tons avermelhados, semelhante à queratina, denominadas assim de células cornificadas ou queratinizadas. A duração desta fase é ao redor de 24 horas.

Metaestro

O metaestro é considerado um período catabólico. Caso tenha ocorrido o acasalamento na fase de estro, é formado o corpo lúteo e a P4 sintetizada atuará na remodelação dos tecidos uterinos. Adicionalmente, a síntese de E2 pelo corpo lúteo continua. No entanto, caso não haja o acasalamento, esta estrutura eventualmente degenera. No útero, são observadas muitas células epiteliais glandulares e lumbais em mitose, além de uma intensa migração de leucócitos polimorfonucleares através do epitélio luminal. Externamente, observa-se o orifício vaginal ainda aberto. O esfregaço vaginal apresenta, através da técnica de Shorr, células anucleadas cornificadas, isoladas e em grumos, além de algumas células epiteliais nucleadas e leucócitos. Esta fase pode ser dividida em Metaestro I e II, e perdura cerca de 10 horas.

Diestro

O diestro é considerado um período quiescente, durante o qual ocorre a regeneração do útero através da proliferação e diferenciação dos fibroblastos do

estroma endometrial. Este período pode ser de curta duração, chamado de diestro, ou de longa duração, chamado anestro. A fêmea do roedor é dita em anestro quando seu ciclo reprodutivo encontra-se interrompido. Nessa fase, as dimensões e a morfologia do útero são semelhantes às observadas em proestro. A genitália externa apresenta-se sem edema e o orifício vaginal está na maioria dos casos estreito. A mucosa é úmida e a secreção vaginal é viscosa. Algumas células epiteliais nucleadas são encontradas no esfregaço vaginal, as quais mostram, através da técnica de Shorr, o citoplasma azul e o núcleo vermelho. O esfregaço é caracterizado neste estágio essencialmente pela presença de muco e de muitos leucócitos polimorfonucleares. O diestro tem duração de 54 a 57 horas, sendo, portanto, a fase de mais longa duração.

Os processos relacionados à ovulação, fecundação e gestação estão sob a regulação de E2 e P4. Sabe-se, desde épocas mais antigas, que a remoção dos ovários resulta na perda da atividade sexual e na infertilidade desses animais. Knauer (1900) evidenciou, ao remover os ovários de porcos da Índia, a importância de substâncias secretadas por essas estruturas no crescimento uterino. Parte considerável dos estudos a respeito das ações exercidas por E2 e P4 está centrada no útero, tornando claro que estes dois hormônios modulam o crescimento deste órgão, regulando a hiperplasia e a hipertrofia de suas células, e a remodelação dos componentes da MEC.

Estudo clássico realizado por Martin e Finn (1969), recentemente revisado por Wood et al. (2007), evidenciou uma intensa remodelação uterina durante o ciclo estral, considerando distintos aspectos. Estes dados mostraram que a largura total do útero era maior em estro, fase de pico de E2, provavelmente devido ao edema característico desta fase. Além disto, foi observado também que E2 estimula a proliferação celular nos diferentes compartimentos uterinos, além de induzir a síntese de receptores de P4 (PR) pelas células alvo. P4, por sua vez, é capaz de inibir a proliferação de células epiteliais e estimular a multiplicação e a diferenciação das células do estroma endometrial, processo importante para o início da decidualização do endométrio (Martin e Finn, 1969). Adicionalmente, o índice de células apoptóticas foi maior em metaestro, fase de notável catabolismo.

A Figura 4 mostra os níveis hormonais no soro de camundongos ao longo do ciclo estral. Outra característica importante é a predominância de P4 em diestro, fase que os tecidos uterinos apresentam aspectos morfológicos peculiares.

Figura 4. Níveis dos hormônios estrógeno e progesterona no ciclo estral (Wood et al., 2007).

O ciclo estral dos roedores adultos é, portanto, dominado pela síntese e secreção de 17β-estradiol (E₂). Adicionalmente, antes da ovulação e da formação do corpo lúteo, pequena quantidade de P4 é produzida pelas células granulosas do folículo de Graaf durante o ciclo estral (Guttenberg, 1961; Drummond et al., 2007), sendo parte desta metabolizada a 20α-hidroxiprogesterona (Bazer et al., 1998). Contudo, se a fêmea é fertilizada, o corpo lúteo é mantido por ação da prolactina hipofisária, a qual atua nos ovários garantindo a síntese de P4. A atividade da dPRP (do inglês *decidual Prolactin-Related Protein*), molécula sintetizada durante a gestação, também é capaz de sustentar a produção de P4 pelo corpo lúteo, além de reduzir a habilidade dos folículos de aromatizar hormônios andrógenos e estradiol (Gibori, 1984). Ambos P4 e E2 promovem a diferenciação dos tecidos uterinos, preparando-os para a implantação do blastocisto (Martin e Finn, 1969).

1.3 Hormônios Esteróides E Seus Receptores

Hormônios esteróides são moléculas regulatórias de natureza lipídica, que atuam através de seus receptores nucleares, ativando genes específicos nas células-alvo (Alberts et al., 2002).

Figura 5A. Molécula de estrógeno.

Figura 5B. Molécula de progesterona.

A atividade dos receptores de esteróides é dependente de ligante e os mesmos são encontrados classicamente no citosol e no núcleo das células. Os receptores de esteróides conhecidos atualmente são os receptores de E2, P4, dos hormônios andrógenos, glicocorticóides e mineralocorticóides, os quais compõem uma superfamília de genes com características estruturais e funcionais comuns. De fato, a estrutura molecular dos receptores de hormônios esteróides é caracterizada pela presença de regiões ou domínios relativamente conservados. A região mais conservada destas moléculas, o domínio de ligação ao DNA, é localizada no centro da proteína e é composta por dois *fingers* de zinco do tipo II, os quais facilitam a ligação do complexo hormônio-receptor ao DNA. Na região carboxil (COOH) se encontra o domínio de interação com o ligante, moderadamente conservado, responsável também pela dimerização dos receptores e, portanto, importante na transativação de genes alvo. Entre estas duas regiões existe um pequeno domínio responsável pela interação do receptor com proteínas *heat shock*, como a Hsp90 (Pratt e Toft, 1997), as quais auxiliam na manutenção do estado inativo deste receptor. A região amino-terminal (NH₂) é a mais variável e regula a ativação do promotor do gene alvo, chamada também de AF-1 ou *ligand-independent transactivation factor* (Lydon et al., 1995).

Os receptores de P4 são o PRA, o PRB e o PRC, e os receptores de E2, o ER α e o ER β . Os receptores de P4 são produtos do mesmo gene e seu RNAm sofre *splicing* alternativo, gerando as diferentes isoformas. Por exemplo, os 164 aminoácidos iniciais na molécula de PRB não estão presentes em PRA, ao passo que PRC é diferente das demais isoformas pela presença de um domínio truncado de ligação ao DNA. ER α e ER β são produtos de dois genes distintos, denominados Esr1 e Esr2. Estes receptores apresentam alta homologia (98%) no domínio de ligação ao DNA e baixa (54%) no domínio de interação com o ligante, apesar de ambos apresentarem alta afinidade por estrogênios endógenos, como o estradiol, a estrona e o estriol (Hewitt e Korach, 2002).

Figura 6. Desenho esquemático mostrando a estrutura dos receptores de hormônios esteróides e suas interações com outras moléculas, incluindo o DNA (Alberts et al., 2002).

Ao ligar-se com o hormônio, estes receptores formam hetero ou homodímeros, que interagem com elementos específicos presentes na região promotora do gene alvo, chamados *estrogen responsive elements* (ERE) ou *progesterone responsive elements* (PRE). No entanto, muitos genes responsivos aos hormônios esteróides não possuem este elemento e sua ativação ocorre através do recrutamento de fatores de transcrição, como SP1 e AP1, pelo complexo hormônio-receptor. Este novo complexo molecular é então translocado para o núcleo, onde irá interagir diretamente com as regiões de ligação a AP1 e SP1 presentes nos genes (O'Lone et al., 2004).

Recentemente, pesquisas têm considerado a existência de receptores de ação rápida, presentes na membrana plasmática das células-alvo. Estes receptores podem ser ou não idênticos aos receptores nucleares. Os efeitos rápidos disparados por estas moléculas, como a produção de óxido nítrico e a ativação de canais de cálcio, são iniciados pela interação do hormônio com seu receptor, presente geralmente em cavéolas, e mediados por mecanismos associados à proteína G (Song et al., 2005). A ativação da proteína G leva à ativação das vias de sinalização de MAPK e adenilato ciclase. Entretanto, o papel desta via não clássica de ação dos hormônios esteróides no endométrio é ainda desconhecido (Matthews e Gustafsson, 2003).

A localização dos receptores de E2 e P4 no útero de roedores já está bem documentada na literatura. Estudos prévios mostraram que estes receptores são expressos nos epitélios luminal e glandular, no estroma endometrial e no miométrio, em diferentes espécies de mamíferos. Zorn et al. (2003) mostraram que existe uma clara hierarquia na expressão destes receptores entre os diferentes compartimentos

uterinos de camundongos. Foi mostrado ainda que as ações opostas de cada hormônio ocorrem por uma regulação interdependente na expressão de ER e PR (Li et al., 1992; Tan et al., 1999).

Interessantemente, foi demonstrado, através de imunolocalização de ER nos tecidos uterinos de camundongos ovariectomizados, e submetidos ou não à reposição hormonal, que ER é constitutivo no miométrio, endométrio e principalmente no epitélio glandular, uma vez que não são abolidos nos animais ovariectomizados e que não receberam a reposição hormonal. A administração de E2 aumenta a expressão de ER no epitélio luminal e no miométrio, e diminui no estroma e no epitélio glandular. A expressão de PR nos animais ovariectomizados é observada nos epitélios luminal e glandular, enquanto apenas traços são observados no estroma e no miométrio. Após administração de E2, a expressão de PR aumenta no estroma e no miométrio e diminui no epitélio luminal, permanecendo igual no epitélio glandular. Interessantemente, a adição de P4 ao tratamento hormonal diminui a intensidade da marcação em todos os compartimentos uterinos, demonstrando um *feedback* negativo da atividade de PR sobre sua própria expressão, na presença de E2 (Tibbitts et al., 1998).

Estudo mais recente analisou a expressão de PR e ER β em animais ovariectomizados e *knock-out* para ER α (α ERKO), submetidos ou não à reposição com E2. Os dados mostraram que, na ausência de reposição, a expressão de PR é presente no epitélio luminal e no estroma superficial, porém fraca no estroma profundo e no miométrio. Após as injeções de E2, a expressão de PR é observada em todo o estroma endometrial e no miométrio, o que sugere que ER β atue induzindo a expressão de PR nestes compartimentos uterinos. Contudo, estudos com animais selvagens ou *knock-out* para ER β (β ERKO) e ovariectomizados mostraram que a expressão de PR é fraca no estroma e no miométrio, e após tratamento com E2 torna-se intensa nestes compartimentos. Este conjunto de dados sugere que ER α e ER β desempenhem papéis semelhantes no útero de roedores, e que são capazes de modular a expressão um do outro (Kurita et al., 2001).

Além da localização de ER e PR nos tecidos uterinos, outros estudos se dedicaram à análise do papel destas moléculas no processo reprodutivo. Experimentos realizados com camundongos *knock-out* para ER α e ER β mostraram que estes animais não atingem a maturidade sexual e apresentam grave disfunção ovariana (Couse et al., 2000). Animais *knock-out* para PR evidenciaram este

hormônio como regulador crucial das funções reprodutivas. Tais camundongos não ovulam, apresentam disfunção uterina, regulação alterada da involução tímica, além de proliferação alterada de células endoteliais e musculares lisas de vasos sangüíneos [Revisão em (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004)].

Adicionalmente, os mecanismos pelos quais E2 e P4 atuam modulando a expressão gênica podem ser diretos ou indiretos, neste último caso através da ativação de fatores de crescimento. O TGF- β exerce diversas funções biológicas, como regulação da proliferação, remodelação tecidual, formação e remodelação da MEC, controle da expressão de moléculas de superfície celular, e imunomodulação (Das et al., 1992). Como o útero sofre tais modificações durante o ciclo estral (Salgado et al., 2009a) e a gestação (San Martin et al., 2003a) e TGF- β é expresso nos tecidos uterinos (Das et al., 1992; Gaide Chevonnay et al., 2008), acredita-se que os hormônios sexuais ovarianos também atuem no útero através da modulação da atividade deste fator de crescimento.

Portanto, o estabelecimento e o sucesso da gestação dependem do balanço na expressão de diferentes moléculas, sejam estas estruturais ou regulatórias. A gestação, por sua vez, pode ser dividida em fase de pré-implantação e fase de pós-implantação, a qual é caracterizada pelo fenômeno da decidualização e posterior formação da placenta. Nestas fases, o útero passa por importantes alterações morfológicas, concomitante com as flutuações características nos níveis hormonais [Revisão em (Abrahamsohn e Zorn, 1993)].

1.4 O Útero Na Gestação

O perfil hormonal com dominância de progesterona que caracteriza a gestação modula o fenótipo dos fibroblastos endometriais de modo que aqueles situados no estroma superficial são globosos e próximos, enquanto os do estroma profundo são alongados e esparsos (Tenório, 1998). Estes estudos ao microscópio de luz foram complementados por estudos ultra-estruturais (Teixeira, 1998), confirmando a existência de fenótipos diferentes dos fibroblastos subepiteliais e profundos. É importante relatar neste ponto que a decidualização do endométrio compreende a aquisição de um fenótipo epitelióide pelos fibroblastos endometriais e que se inicia nas células subjacentes à cripta de implantação, portanto nos fibroblastos subepiteliais (Abrahamsohn et al., 2002).

A implantação embrionária envolve interações hormonais, bioquímicas e estruturais únicas entre dois organismos geneticamente distintos. Segue-se, a partir deste evento, uma série de modificações no microambiente uterino, que culmina com a formação de uma nova estrutura, denominada decídua, a qual desempenha variadas e essenciais funções na gestação inicial, entre estas, a de glândula endócrina provisória. Ao redor de cada embrião, o estroma endometrial, antes formado por um tecido conjuntivo frouxo constituído por fibroblastos, adquire características epitelióides, formado por células poliédricas, unidas por junções intercelulares e envolvidas por uma escassa matriz extracelular. Estas novas células são denominadas *células deciduais* [Revisão em (Abrahamsohn e Zorn, 1993; Abrahamsohn et al., 2002)]. A decidualização do endométrio se constitui, portanto, em um excelente exemplo de transdiferenciação, isto é, um tipo especial de diferenciação celular, no qual a conversão de um tipo celular já diferenciado ocorre sem que haja uma célula indiferenciada como intermediária (Zorn, 2005).

Na gestação de roedores, para que a reação decidual ocorra, além de níveis adequados de hormônios sexuais ovarianos, é necessário o contato entre as células trofoblásticas do embrião com o epitélio uterino, o qual é transdutor de sinais moleculares para o estroma subjacente (Lejeune et al., 1981). De fato, estudo recente mostrou que a expressão do *Lhh*, da família *hedgehog* de moléculas morfogenéticas, é controlada por P4 no epitélio uterino e modula as alterações celulares que ocorrem no estroma no início da gestação (Lee et al., 2006). Contudo, embora uma série de moléculas, incluindo prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas e fatores de transcrição, tenha sido identificada, nenhuma delas preenche completamente os requisitos de moléculas chave para o processo de implantação.

A decidualização tem início no estroma subjacente ao epitélio da cripta de implantação, progredindo de maneira centrífuga em direção ao estroma profundo, adjacente ao miométrio (Abrahamsohn, 1983). Interessantemente, são criadas no endométrio regiões compostas por células em diferentes estágios de transformação decidual, as quais exibem fenótipos distintos. A primeira região, próxima ao epitélio uterino, é formada por células plenamente decidualizadas. Ao redor destas, encontra-se a região da pré-decídua, formada por células em processo de decidualização com fenótipo intermediário entre células deciduais maduras e fibroblastos endometriais não diferenciados. A terceira e última região, nas imediações do miométrio, é formada por fibroblastos que não respondem ao

estímulo decidualogênico, sendo morfológicamente semelhantes às células observadas no estroma profundo durante o ciclo estral, e é denominada de região não decidualizada (Abrahamsohn, 1983).

A nova arquitetura e fisiologia celular, e a consequente redução dos espaços intercelulares são acompanhadas de uma intensa remodelação dos componentes da MEC endometrial. Tais modificações têm início na fase de pré-implantação com a fragmentação da rede de fibronectina (Grinnel et al., 1982; Tenório, 1998) e, em seguida, com o conspícuo espessamento das fibrilas de colágeno, observado na MEC da decídua (Zorn et al., 1986; Alberto-Rincon et al., 1989).

1.5 A Matriz Extracelular Do Útero

A MEC é uma estrutura tri-dimensional complexa formada por macromoléculas capazes de interagir entre si e com as células, composta predominantemente por colágenos, glicoproteínas multiadesivas, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Kresse e Schönherr, 2001).

A MEC exerce basicamente duas funções: estrutural, preenchendo os espaços extracelulares dos tecidos; e de interação com as células, mediando adesão, crescimento, migração e diferenciação celular. Adicionalmente, a MEC contém fatores de crescimento, citocinas e enzimas de degradação, além de peptídeos crípticos que são expostos pela ação das peptidases, podendo, portanto, modular a fisiologia celular (Schenk e Quaranta, 2003; Mott e Werb, 2004).

O ciclo fisiológico das macromoléculas da MEC compreende as seguintes etapas: expressão e regulação gênica, tradução, modificações pós-transcricionais, como hidroxilação, glicosilação e sulfatação, secreção, modificações extracelulares, interações moleculares com outros componentes da matriz e com receptores de superfície celular, degradação enzimática, endocitose e processamento nos lisossomos (Aplin, 2002).

Nos roedores, a MEC uterina é abundante durante o ciclo estral e no início da gestação, tornando-se mais escassa nas regiões decidualizadas. Em humanos, a MEC endometrial exerce papéis importantes nos processos de decidualização, implantação do embrião, invasão do trofoblasto e manutenção da gestação (Iwahashi et al., 1996).

Estudos com animais deficientes do receptor de IL-11, uma citocina essencial para o processo de decidualização, mostraram que estes animais apresentam falhas na formação da decídua e na implantação embrionária (White et al., 2004). É importante relatar que alguns dos estudos conduzidos pelo nosso laboratório subsidiaram e são citados nos estudos de White, uma vez que a maioria das moléculas da MEC estudadas pelo nosso laboratório foi alterada nos animais *knock-out* para IL-11R.

Como veremos adiante, estudos prévios demonstraram que os hormônios ovarianos podem influenciar direta ou indiretamente a síntese e a deposição de componentes da MEC, como os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos.

O Laboratório de Biologia da Reprodução & Matriz Extracelular tem se dedicado ao estudo de macromoléculas da MEC do endométrio, evidenciando intensa remodelação na sua expressão e distribuição, como demonstrado para tipos de colágeno distintos, tais como os colágenos I, III e V (Zorn et al., 1986; Spiess e Zorn, 2007), proteoglicanos (San Martin et al., 2003a; b; Salgado et al., 2009a) e glicosaminoglicanos (Zorn et al., 1995; Greca et al., 1998; San Martin et al., 2003b).

1.5.1 Proteoglicanos

Os proteoglicanos são moléculas formadas por um eixo protéico, ao qual se ligam covalentemente cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs). Essas macromoléculas são de tamanhos e formas variados, de modo que apenas a presença do GAG em seu eixo protéico é característica comum a todos os proteoglicanos. A classificação dos GAGs é feita de acordo com a composição monomérica, tipo de ligações glicosídicas intra e inter-dissacarídicas, além do grau e da posição da sulfatação. Os GAGs são polissacarídeos compostos por inúmeras repetições de dissacarídeos, onde um dos açúcares é um ácido urônico (idurônico ou glicurônico) e o outro é uma N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina.

Os GAGs conhecidos são o condroitim, dermatam, heparam e queratam sulfato, além da heparina e do ácido hialurônico (HA). Com exceção do HA, um ou ambos os açúcares do GAG contem um ou dois resíduos de sulfato. Portanto, cada cadeia lateral de GAG possui carga altamente negativa, o que possibilita os proteoglicanos de se ligarem a moléculas carregadas positivamente (Wu et al., 2005).

A versatilidade dos proteoglicanos e sua capacidade de interagir com outras moléculas lhes conferem a habilidade de funcionar como ligantes nas interações celulares, as quais são importantes durante o desenvolvimento e nas remodelações teciduais (Ruoslahti, 1989).

Figura 7. Estrutura básica de um proteoglicano

Estudo pioneiro realizado por Zachariae (1958) mostrou, através de radioautografia, que o E2 era capaz de estimular a produção de mucopolissacarídeos (glicosaminoglicanos) no útero de coelhos, enquanto que P4 exercia papel contrário, bloqueando este efeito e inibindo a síntese destas moléculas. Posteriormente, outro estudo radioautográfico mostrou a distribuição de sulfomucopolissacarídeos no útero de ratos após ovariectomia e reposição hormonal com E2 e/ou P4. O tratamento com E2 e P4 combinados aumentou consideravelmente a quantidade de grãos de prata, principalmente no estroma, em relação aos outros grupos estudados, evidenciando a relação entre o perfil hormonal e a cinética de síntese e deposição de componentes da MEC (Bo et al., 1965).

De fato, Takata e Terayama (1977) mostraram que E2 e, em menor quantidade P4, são capazes de aumentar o conteúdo geral de glicosaminoglicanos no útero de ratos, especialmente de condroitim e dermatam sulfato. Em seguida, foi demonstrado que E2 modula também os proteoglicanos de heparim sulfato e que sua localização na membrana plasmática das células epiteliais é regulada durante o ciclo estral e após reposição hormonal (Hayashi et al., 1988).

De acordo, Morris *et al.* (1988) mostraram que o estradiol induz modificações celulares que resultam em um acúmulo de proteoglicanos de heparam sulfato no epitélio uterino imediatamente antes da implantação do blastocisto. Estes dados sugerem que a expressão de moléculas da matriz extracelular está diretamente relacionada com o estado hormonal do animal.

Estudo posterior mostrou que E2 estimula o aumento da síntese do RNAm de sindecam-3 e modula o padrão de distribuição deste proteoglicano nos tecidos uterinos de rato (Russo *et al.*, 2001). Germeyer *et al.*, (2006) estudaram quatro isoformas do sindecam no útero de humanos durante o ciclo menstrual e mostraram que o sindecam-1 e o sindecam-4 aumentam na fase secretória em comparação com a fase proliferativa. O sindecam é um proteoglicano de heparam sulfato presente na membrana plasmática, e pode se ligar a fatores de crescimento, componentes da MEC, enzimas diversas, inibidores de proteases e citocinas, exercendo papel importante nas sinalizações intracelulares.

Estudos sobre a síntese de glicosaminoglicanos sulfatados, utilizando a técnica de radioautografia, mostraram significativa modulação na incorporação do S^{35} pelas células endometriais de animais não grávidos e grávidos, bem como entre os diferentes compartimentos celulares do útero destes animais (Zorn *et al.*, 1995). Em seguida, estudos citoquímicos ultra-estruturais utilizando corantes catiônicos (Safranina O, Azul cuprolínico e Rutênio hexamina tricloreto) evidenciaram variações na distribuição da rede de proteoglicanos da MEC entre as diferentes regiões do endométrio decidualizado, assim como entre diferentes dias de gestação, indicando uma relação entre a composição de proteoglicanos da MEC e o estado de decidualização do endométrio (Greca *et al.*, 1998).

Outros estudos (Wu *et al.*, 2000) mostraram que a síntese do RNAm de decorin aumenta após indução por estradiol e durante o parto, no miométrio de ovinos. De fato, foi demonstrado que o decorin representa 63% do conteúdo geral de proteoglicanos no miométrio humano durante a parturição (Hjelm *et al.*, 2001).

Posteriormente, San Martin *et al.* (2003a) mostraram a distribuição dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) decorin, biglicam, fibromodulin e lumican no útero de camundongo e que estas são remodeladas de modo temporo-espacial nos tecidos uterinos durante a gestação. Interessantemente, estudos ao microscópio eletrônico (San Martin e Zorn, 2003) mostraram que o biglicam está associado a fibrilas espessas de colágeno na decídua e que o decorin

se associa exclusivamente às fibrilas finas nestas áreas decidualizadas. Sabe-se ainda que esses proteoglicanos são relevantes também em processos biológicos, tais como a diferenciação e a proliferação celular durante a gestação.

Zorn et al. (1995) mostraram, por estudos bioquímicos, um aumento de HA no endométrio de camundongos no período da implantação do embrião. Posteriormente, San Martin et al. (2003b) mostraram, através de estudos histoquímicos, que este glicosaminoglicano não sulfatado estava presente no período pré-implantacional, desaparecendo posteriormente, na região decidualizada do endométrio. As modificações na expressão do ácido hialurônico, observadas durante a gestação, indicam que esta molécula deve participar da preparação do estroma endometrial para a implantação do embrião e a posterior decidualização.

O versicam e o perlecam também foram estudados pelo nosso laboratório no útero de camundongo durante a gestação (San Martin et al., 2003b; 2004). No período de pré-implantação, o perlecam apresentou forte marcação na membrana basal do epitélio luminal, particularmente nas re-entrâncias das ramificações. Uma forte marcação foi observada na membrana basal dos vasos sangüíneos e do músculo liso do miométrio. O perlecam também esteve presente na MEC do endométrio, ao redor de fibroblastos. No período pós-implantação, este proteoglicano foi observado nos tecidos embrionários (San Martin et al., 2004).

San Martin et al. (2003b), utilizando um anticorpo que reconhece todas as isoformas de versicam, mostrou distribuição peculiar desta molécula no útero de camundongos nos períodos de peri- e pós-implantação. No 4º dia de gestação (dg) esteve presente na região apical do epitélio glandular, no citoplasma das células do estroma, especialmente na região subepitelial e na membrana basal do epitélio luminal. No 5º e no 6º dias, observou-se forte marcação nas regiões da decídua, pré-decídua, e fraca no estroma não decidualizado. No 7º dg, a imunoreação para o versicam foi intensa ao redor de células deciduais maduras e fraca na pré-decídua e no estroma não decidualizado.

Tais resultados obtidos previamente sugerem a importância dos proteoglicanos na remodelação do estroma endometrial e do miométrio na preparação do útero para a decidualização, implantação e desenvolvimento do embrião. Esta intensa remodelação de componentes da MEC do endométrio durante as diferentes fases da

gestação deu origem à hipótese do controle hormonal sobre a síntese, distribuição e degradação dessas moléculas nos tecidos uterinos.

1.5.2 Pequenos Proteoglicanos Ricos Em Leucina (SLRPs)

A família dos **SLRPs** compreende cerca de dezessete genes que apresentam homologias estruturais, tais como a presença de resíduos de cisteína, repetições ricas em leucina e pelo menos uma cadeia de GAG ligada à proteína central. Estes proteoglicanos são divididos em cinco classes distintas (Hocking et al., 1998; Iozzo, 1999; Schaefer e Iozzo, 2008).

Decorin e **biglicam** pertencem à classe I e apresentam semelhanças na sua sequência de aminoácidos, nas cadeias laterais de condroitim ou dermatam sulfato e um *cluster* de resíduos de cisteína na região N-terminal, formando duas pontes dissulfeto. Biglicam contém duas cadeias de condroitim ou dermatam sulfato e uma proteína central de 38 kDa. Decorin contém uma cadeia de condroitim ou dermatam sulfato e uma proteína central de 36 kDa. Ambos proteoglicanos, quando apresentam cadeias de condroitim sulfato, são normalmente isolados do osso fetal, enquanto os que apresentam dermatam sulfato são isolados da cartilagem articular. Sabe-se que o decorin é relativamente abundante na MEC dos ossos, tendões, esclera, pele, aorta e córnea [Revisão em (Schaefer e Iozzo, 2008)]. Dados da literatura têm mostrado que estas moléculas podem se ligar ao colágeno, participando na sua fibrilogênese (Vogel et al., 1984; Hocking et al., 1998; San Martín, 2003), além de se ligarem a fatores de crescimento como o TGF β , modulando sua atividade nos tecidos (Kresse e Schönherr, 2001).

Lumican e **fibromodulim** pertencem à classe II, e apresentam cadeias laterais de queratam sulfato e polilactosamina, assim como *clusters* de resíduos de tirosina sulfatada na porção N-terminal. O fibromodulim é abundante em vários tecidos conjuntivos, como a cartilagem, o tendão e a pele. Sua proteína central é formada por 357 resíduos de aminoácidos (42 kDa). O lumican é amplamente expresso na córnea, músculo, intestino e cartilagem. Sua proteína central é formada por 338 aminoácidos (37 kDa). Na córnea, o lumican possui cadeias de queratam altamente sulfatadas e desempenha papel importante na manutenção da transparência corneal. No entanto, em outros tecidos, o lumican é normalmente

encontrado como um proteoglicano pouco sulfatado ou uma glicoproteína não sulfatada (San Martin, 2003; Schaefer e Iozzo, 2008). Estes proteoglicanos também possuem a propriedade de interagir com fibrilas de colágeno, competindo pelo sítio de ligação a esta molécula (Svensson, 1999), e atrasando o crescimento lateral das fibrilas *in vitro* (Vogel et al., 1984; Rada et al., 1993).

Figura 8. Estrutura molecular dos SLRPs

Os SLRPs são moléculas dinâmicas, capazes de induzir cascatas de sinalização intracelular através de receptores tirosina quinase, receptores *Toll-like* e receptores de BMP e TGF- β .

Os receptores tirosina quinase EGFR e IGF-IR estão envolvidos no estímulo inicial de diversas respostas celulares. Em células tumorais, por exemplo, decorin é capaz de se ligar a EGFR e ativar a cascata de MAPK, o influxo de cálcio, além de induzir a expressão de p21 (inibidor de cdk) e a internalização do receptor mediada por caveolinas (De Luca et al., 1996; Moscatello et al., 1998). Estes eventos intracelulares sugerem que decorin e EGF interagem e suprimem a divisão celular e o crescimento do tumor. Interessantemente, a interação de decorin com a cascata de IGF-IR/mTOR/p70 S6 quinase leva ao aumento da tradução da fibrilina-1 e sua deposição na MEC (Schaefer et al., 2007).

Estudos anteriores sugerem que o biglicam esteja envolvido na regulação da resposta inflamatória, recrutando células deste repertório para os tecidos (Schaefer e Iozzo, 2008). De fato, biglicam é capaz de se ligar a TLR4 e TLR2 em macrófagos, estimulando a síntese de mediadores inflamatórios, como o TNF α e o MIP2, através da cascata de Erk, p38 e NF-KB (Schaefer et al., 2005). O lumican também pode interagir com TLR4 e suas cascatas de sinalização, através da apresentação da LPS (lipopolissacarídeo) presente na parede celular de bactérias invasoras a CD14 na superfície das células inflamatórias (Wu et al., 2007).

Decorin, biglicam, asporin e fibromodulin são capazes de se ligar ao TGF- β . Decorin é conhecido por inibir a ação deste fator de crescimento, inibindo assim a proliferação celular. Estudos indicam que o decorin associado às fibrilas de colágeno seqüestra este fator de crescimento na MEC (Hildebrand et al., 1994). O biglicam, por outro lado, está presente principalmente na matriz pericelular e especula-se que não seja uma molécula adequada para interagir com o TGF- β na MEC. No entanto, o biglicam está relacionado com as BMPs no controle do desenvolvimento embrionário (Moreno et al., 2005). Além disto, na ausência de biglicam e fibromodulin, células progenitoras dos tendões são mais sensíveis a BMP2, o qual inibe a formação do tendão durante o desenvolvimento (Bi et al., 2007). No entanto, são desconhecidos os mecanismos que estas moléculas utilizam na remodelação dos tecidos uterinos de camundongo.

De acordo com San Martín et al. (2003a), decorin e lumican estavam amplamente distribuídos no endométrio durante o período pré-implantacional, enquanto o biglicam foi debilmente detectado, e o fibromodulin esteve ausente. Interessantemente, a perda do decorin no estroma endometrial precede a diferenciação decidual. O lumican mostrou uma distribuição similar a de decorin, sendo observada uma débil imunoreação entre as células deciduais. O biglicam foi observado inicialmente no citoplasma das células do estroma no 5º dg. No 6º dg, a imunoreação foi observada na região pré-decidual e, posteriormente, no 7º dg, o biglicam estava entre as células da decídua madura, região onde se concentram as fibrilas espessas de colágeno (Zorn et al., 1986). Após a implantação, o fibromodulin foi restrito apenas ao estroma profundo do endométrio (região não-decidualizada) e no tecido conjuntivo do miométrio.

As alterações observadas na distribuição dos SLRPs no útero de camundongo certamente requerem a exposição do animal a um regime hormonal bem definido. O

perfil hormonal do animal associado ao estímulo provido pelo embrião são essenciais no momento da implantação (Finn, 1977; Parr e Parr, 1989; Abrahamsohn e Zorn, 1993).

1.5.3 Perlecam

O **perlecam** é um proteoglicano de heparam sulfato presente em vários tecidos, exercendo nestes inúmeras funções biológicas (Iozzo, 1998). As cadeias laterais de GAG estão ligadas à proteína central na região N-terminal e interagem com FGF-2, promovendo a angiogênese e a proliferação celular. As moléculas de heparam sulfato também são capazes de interagir com outros componentes de membrana basal, como a laminina e o colágeno IV, e com moléculas de superfície celular, desencadeando sinalizações celulares (Olsen, 1999).

O eixo protéico do perlecam é um dos maiores produtos gênicos conhecidos (400-450 kDa) e é dividido em cinco módulos (I-V). Cada módulo exerce funções específicas, possibilitando a este proteoglicano se ligar a diferentes moléculas, como a fibronectina na MEC e a integrina na superfície celular (Olsen, 1999).

O perlecam é conhecido como um proteoglicano de membranas basais, mas também é encontrado em muitas matrizes extracelulares, como no interstício da cartilagem, exercendo papéis biológicos sinalizadores relevantes durante a ossificação endocondral (Handler et al., 1997). Interessantemente, o perlecam desempenha importante função protetora, impedindo que as membranas basais sejam destruídas pela ação proteolítica de enzimas de degradação da MEC (Olsen, 1999).

Estudo prévio com camundongos *knock-out* para perlecam revelaram a severidade das anormalidades decorrentes da ausência desta molécula. A maioria dos embriões morre entre os dias 10 e 12 do desenvolvimento, devido a defeitos no saco pericárdico (Costell et al., 1999).

Contudo, sabe-se que o perlecam é relevante no desenvolvimento embrionário mesmo antes destes acontecimentos, pois exerce papel importante na interação primordial do embrião com a parede uterina no momento da implantação, quando ocorre o aumento da expressão do seu RNAm e da deposição da sua proteína na membrana basal do trofoectoderma (Smith et al., 1997). Adicionalmente, San Martin et al. (2004) demonstraram a expressão de perlecam em tecidos embrionários de

camundongos entre os dias 5 e 7 da gestação. Sua deposição foi observada na superfície do trofoblasto, entre o ectoderma e o endoderma, e na membrana de Reichert.

Figura 9. Molécula do perlecan, evidenciando seus módulos (Glycoword)

1.5.4 Versicam

O **Versicam** é um proteoglicano de condroitim sulfato que pertence à família das hialectinas, denominada desta forma pela habilidade de seus membros de se ligarem ao HA na matriz extracelular. Outros membros da família das hialectinas incluem o agreca (cartilagem), o neurocam e o brevicam (tecido nervoso). A região central do *core* protéico é codificada por dois longos exons (exon 7 - α GAG e exon 8 - β GAG), onde se ligam as cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs) (Shinomura et al., 1995; Wight 2002). Nestes exons ocorre *splicing* do RNAm, gerando quatro isoformas distintas, denominadas V0, V1, V2 e V3. A isoforma V0 possui ambos os exons, V1 possui apenas o exon 8, V2 possui apenas o exon 7 e V3 não possui nenhum dos dois (Zimmermann, 2000). Além disso, estudo pioneiro conduzido por Shinomura et al. (1995) demonstrou que o gene do versicam é transcrito em pelo menos sete espécies diferentes de RNAm. No entanto, são geradas apenas as 4 isoformas mencionadas pelo *splicing* dos exons VII e VIII. A análise molecular por Northern Blot revelou a presença de transcritos de 12, 10, 9 e 8 kb. Estes são detectados devido ao uso aleatório, durante o *splicing* do RNAm do

versicam, de quatro sítios de poliadenilação AATAAA, presentes na região 3' não transcrita do gene.

A interação entre versicam e HA é mediada pelo domínio globular G1 (NH₂) do versicam, sendo responsável pela formação de uma matriz altamente hidratada. O domínio G3 (COOH) é formado por um domínio tipo lectina, dois domínios de fator de crescimento epidermal (EGF) e uma região de regulação do sistema complemento.

O versicam também interage com outras moléculas da MEC, tais quais a tenascina-R, o colágeno I, a fibronectina e a fibrilina-1 (Isogai et al., 2002). Interessantemente, verificamos que a fibrilina-1 está presente no estroma endometrial nas fases de estro e diestro (Stumm e Zorn 2007). Versicam também interage com receptores de superfície celular, como o CD44, a integrina- β_1 , o EGFR e algumas selectinas (Wu et al., 2005). Estas interações facilitam processos biológicos relevantes, como a migração, a adesão e a diferenciação celular (Wight, 2002).

A expressão das diferentes isoformas do versicam influencia a formação e organização de uma complexa rede macromolecular na MEC e modula interações célula-célula e célula-matriz (Shinomura et al., 1995). Além disto, podemos sugerir que o *splicing* do RNAm do versicam está relacionado a funções distintas que cada domínio de sua molécula e, portanto cada isoforma, possa exercer nos tecidos.

Figura 10. Molécula do versicam e suas interações (adaptado de Wu et al., 2005).

Ambas as isoformas V0 e V1 desempenham os mesmos papéis, como anti-adesão das células, crescimento e proliferação celulares, e resistência dos fibroblastos à apoptose. A isoforma V2, ao contrário, é conhecida por inibir o crescimento e a proliferação celulares, e por ser expressa apenas no sistema nervoso, como a principal isoforma no cérebro adulto (Schmalfeldt et al., 1998). A isoforma truncada V3, às vezes chamada *versicant* por não apresentar características básicas de um proteoglicano, é conhecida por possuir propriedades pró-adesivas, devido à ausência das cadeias de condroitim sulfato altamente negativas (Zako et al., 1995).

Figura 11. Esquema das isoformas do versicam. Região α -GAG está representada em vermelho e a β -GAG em verde (adaptado de Kloeckener-Gruissem e Amstutz, 2009).

6 CONCLUSÕES

Fundamentados nos resultados obtidos no presente estudo, concluímos que:

- 1) Intensa remodelação ocorre na estrutura, organização celular e na MEC dos tecidos uterinos de camundongo durante o ciclo estral, após ovariectomia e posterior reposição hormonal com E2 e MPA. A compartimentalização do estroma endometrial em superficial e profundo é uma das características mais marcantes, orquestradas pelos hormônios ovarianos.
- 2) Os proteoglicanos decorim, biglicam, fibromodulim, lumican, perlecan e versican apresentam distribuição diferencial nos tecidos uterinos, de acordo com as fases do ciclo estral e do perfil hormonal dominante. Cada subcompartimento do útero reage de forma peculiar ao estímulo hormonal.
- 3) As isoformas V0, V1 e V3, produtos do *splicing* alternativo do gene do versican, estão presentes no útero. A isoforma V2 está ausente em todos os grupos estudados.
- 4) A expressão do RNAm do versican é regulada por estrógeno e progesterona no útero de camundongo, sendo seu perfil dominante após a reposição com MPA. A transcrição gênica deste proteoglicano não é abolida após a ovariectomia e outros fatores pós-transcricionais devem ser considerados ao estudar fenômenos biológicos relacionados à regulação hormonal.
- 5) A associação de abordagens estruturais *in situ* e abordagens moleculares, como adotada neste estudo, demonstrou a enorme importância da primeira, para a melhor compreensão das relações funcionais entre os diferentes compartimentos dos órgãos, particularmente o útero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* **De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Abrahamsohn PA. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat Embryol.* 1983;166:263-74.

Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Implantation and decidualization in rodents. *J Exper Zool.* 1993;266:603-28.

Abrahamsohn PA, Zorn TMT, Oliveira S. Decidua in Rodents. In: Glasser SR, Aplin JD, Giudice LC, Tabibzadeh S, editors. *The Endometrium*. London: Taylor & Francis; 2002. p. 279-93.

Akcali KC, Khan SA, Moulton BC. Effect of Decidualization on the Expression of bax and bcl-2 in the Rat Uterine Endometrium. *Endocrinology.* 1996;137(7):3123-30.

Alberto-Rincon MC, Zorn TMT, Abrahamsohn PA. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Am J Anat.* 1989;186:417-29.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development.* 1996;122:1723-36.

Alimohamad H, Habijanac T, Larjava H, Häkkinen L. Colocalization of the collagen-binding proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin and lumican with different cells in human gingiva. *J Period Res.* 2005;40:73-86.

Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *Am J Anat.* 1927;30: 297-371.

Aplin JD. Endometrial Extracellular Matrix. In: Glasser SR, Aplin JD, Giudice LC, Tabibzadeh S, editors. *The Endometrium*. London: Taylor & Francis; 2002. p 294-307.

Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl-Jockschat T, Doerfelt A, Bogdahn U, Hau P. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta2. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1560-8.

Bazer FW, Ott TL, Spender TE. In: Bazer FW, editor. *Endocrinology of Pregnancy*. New Jersey:Humana Press; 1998. p. 1-34.

Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007;13(10):1219-27.

Bo WJ, Smith S, Reiter R, Pizzarello DJ. The effect of ovarian hormones on the sulphomucopolysaccharides of the uterus. *J Histochem Cytochem.* 1965;13(6):461-69.

Capelo LP, Beber EH, Huang SA, Zorn TM, Bianco AC, Gouveia CH. Deiodinase-mediated thyroid hormone inactivation minimizes thyroid hormone signaling in the early development of fetal skeleton. *Bone*. 2008;43(5):921-30.

Carbone K, Pinto NMP, Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Arrangement and fine structure of collagen fibrils in the decidualized mouse endometrium. *Microsc Res Tech*. 2006;69: 36-45.

Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J*. 2003;19(4-5):287-93.

Chen CP, Liu SH, Lee MY, Chen YY. Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua. *Placenta*. 2008;29(4):309-16.

Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:232-39.

Constanzo LS. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1999. p. 392.

Conti C. Revisión anatómica y funcional del aparato reproductor del ratón. In: Serie Ponencias. Manual de Técnicas básicas de criopreservación de gametos y embriones de ratón. Madrid: Ciemat. Avda. Complutense; 2001.

Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol*. 1999;147:1109–22.

Couse JF, Hewitt SC, Korach KS. Receptor null mice reveal roles for estrogen receptor α and β in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;74:287-96.

Das SK, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK. Expression of transforming growth factor- β isoforms (β 2 and β 3) in the mouse uterus: analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids. *Endocrinology*. 1992;130(6):3459-66.

De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(31):18961-5.

Domino SE, Hurd EA. LacZ expression in Fut2-LacZ reporter mice reveals estrogen-regulated endocervical glandular expression during estrous cycle, hormone replacement, and pregnancy. *Glycobiology*. 2004;14:169-75.

Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR. A novel glycosaminoglycans attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem*. 1994;269:32992-8.

Drummond AE, Tellbach M, Dyson M, Findlay JK. Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology*. 2007;148:3711-21.

Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1004-13.

Finn CA. The implantation reaction. In: Wynn RM, editor. *Biology of the Uterus*. New York: Plenum Press; 1977. p. 245-308.

Freeman ME. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. *The Physiology of Reproduction*. 2^a ed. New York: Raven Press Ltd; 1994. p. 613-58.

Gaide Chevronnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriët P, et al. Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology*. 2008;149(3):1015-25.

Germayer A, Klinkert MS, Huppertz AG, Clausmeyer S, Popovici RM, Strowitzki T, et al. Expression of syndecans, cell-cell interaction regulating heparan sulfate proteoglycans, within the human endometrium and their regulation throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2007;87:657-63.

Gibori G, Kalison B, Basuray R, Rao MC, Hunzicker-Dunn M. Endocrine role of the decidual tissue: decidual luteotropin regulation of luteal adenyl cyclase activity, luteinizing hormone receptors, and steroidogenesis. *Endocrinology*. 1984;115:1157-63.

Glasser SR. Biochemical and structural changes in uterine endometrial cell types following natural or artificial deciduogenic stimuli. *Troph Res*. 1990;4:377-416.

Gouon-Evans V, Pollard JW. Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. *Endocrinology*. 2001;142(10):4515-21.

Greca CP, Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes. *Tissue Cell*. 1998;30: 304-11.

Grinnel F, Head JR, Hoffpauir J. Fibronectin and cell shape in vivo: studies on the endometrium during pregnancy. *J Cell Biol*. 1982;94:597-606.

Gunin AG, Mashin IN, Zakharov DA. Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol*. 2001;169:23-31.

Gutemberg I. Plasma levels of "free" progestin during the estrous cycle in the mouse. *Endocrinology*. 1961;68:1006-09.

Guyette WA, Matusik RJ, Rosen JM. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell*. 1979;17(4):1013-23.

Handler M, Yurchenco PD, Iozzo RV. Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev Dyn*. 1997;210(2):130-45.

Hayashi K, Hayashi M, Boutin E, Cunha GR, Bernfield M, Trelstad RL. Hormonal modification of epithelial differentiation and expression of cell surface heparan sulfate proteoglycan in the mouse vaginal epithelium. *Lab Invest.* 1988;58(1):68-76.

Heikaus S, Winterhager E, Traub O, Grümmer R. Responsiveness of endometrial genes Connexin26, Connexin43, C3 and clusterin to primary estrogen, selective estrogen receptor modulators, phyto- and xenoestrogens. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(2):239-49.

Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3(3):193-200.

Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302(Pt 2):527-34.

Hjelm A, Ekman-Ordeberg G, Barchan K, Malmström A. Identification of the major proteoglycans from human myometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80(12):1084-90.

Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 1998;17:1-19.

Ing NH. Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod.* 2005;72:1290-96.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-52.

Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999;274:18843-6.

Iozzo RV, Zoeller JJ, Nyström A. Basement membrane proteoglycans: modulators of cancer growth and angiogenesis. *Mol Cells.* 2009;27(5):503-13.

Irving-rogers HF, Catanzariti KD, Aspden WJ, D'Occhio MJ, Rodgers RJ. Remodeling of extracellular matrix at ovulation of the bovine ovarian follicle. *Mol Reprod Dev.* 2006;73(10):1292-302.

Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP, Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem.* 2002;277:4565-72.

Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M, Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem.* 1995;270(2):958-65.

Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil.* 1996;108:147-55.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kabir N, Chaturvedi K, Liu LS, Sarkar DK. Transforming growth factor-beta3 increases gap-junctional communication among folliculostellate cells to release basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 2005;146(9):4054-60.

Katsuda SI, Yoshida M, Watanabe T, Kuroda H, Ando-Lu J, Takahashi M, et al.. Estrogen receptor mRNA in uteri of normal estrous cycling and ovariectomized rats by in situ hybridization. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;221(3):207-14.

Kim HJ, Lee GS, Ji YK, Choic KC, Jeung EB. Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E234-41.

Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signaling in stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2005;11:801-8.

Kloeckener-Gruissem B, Amstutz C. VCAN-Related Vitreoretinopathy. GeneReview [Homepage na internet]. 2009; Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=wagner>).

Knauer E. Die Ovarientransplantation. *Arch Gynakol*. 1900;60:322-76.

Kresse H, Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*. 2001;189:266-74.

Kurita T, Lee K, Saunders PTK, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, et al.. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- α knock-out mouse. *Biol Reprod*. 2001;64:272-83.

LeBaron RG. Versican. *Perspect Dev Neurobiol*. 1996;3:261-71.

Lee GS, Jeung EB. Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E132-8.

Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soergiato DW, et al.. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet*. 2006;38(10):1204-9.

LeJeune B, Van Hoek J, Leroy F. Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *J Reprod Fertil*. 1981;61:235-40.

Li W, Boomsma RA, Verhage HG. Immunocytochemical analysis of estrogen and progestin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cat. *Biol Reprod*. 1992;47:1073-81.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery Jr CA, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*. 1995;9:2266-78.

Martin L, Finn CA. Duration of progesterone treatment required for a stromal response to oestradiol-17 β in the uterus of the mouse. *J Endocrinol*. 1969;44: 279-80.

Matthews J, Gustafsson J. Estrogen Signaling: a subtle balance between ER α and ER β . *Mol Interv*. 2003;3(5):281-92.

Miqueloto CA. Caracterização histoquímica e imunocitoquímica de moléculas da matriz extracelular em embriões de camundongos entre os estágios E9 ap E15 do desenvolvimento [tese/thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, et al. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):R26.

Moreno M, Muñoz R, Aroca F, Labarca M, Brandan E, Larraín J. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway. *EMBO J*. 2005;24(7):1397-405.

Morris JE, Potter SW, Gaza-bulseco G. E2 induces an accumulation of free heparan sulphate glycosaminoglycans chains in uterine epithelium. *Endocrinology*. 1988;122:242-53.

Moscattello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*. 1998;101(2):406-12.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 16(5):558-64.

Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*. 2004;128:139-46.

Nuttall RK, Kennedy TG. Gelatinases A and B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2 e 3 during in vivo and in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells. *Biology of Reproduction*. 1999;60:471-78.

Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol*. 1999;147(5):909-11.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2004;18(8):1859-75.

Parr MB, Parr EL. The implantation reaction. In: Wynn RM and Jollie WP, editors. *Biology of the Uterus*, 2nd ed. New York: Plenum Publishing Corporation; 1989. p. 233-277.

Perez MC, Furth EE, Matzura PD, Lyttle CR. Role of eosinophils in uterine responses to estrogen. *Biol Reprod.* 1996;54:249-54.

Perissinotto D, Iacopetti P, Bellina I. Avian neural crest cell migration is diversely regulated by two major hyaluronan-binding proteoglycans: PG-M/versican and aggrecan. *Development.* 2000;127:2823-42.

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock proteins and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 1997;18:306-60.

Qian H, Fan MW, Xiao Y, Bartold PM. Immunohistochemical localization and expression of fibromodulin in the periodontium. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83:1682-85.

Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exper Eye Res.* 1993;56:635-48.

Rahmani M, Wong BW, Ang L, Cheung CC, Carthy JM, Walinski H et al. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(1):77-92.

Rajabi M, Solomon S, Poole AR. Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology.* 1991;128(2):863-71.

Rao KS, Sirdeshmukh R, Gupta PD. Modulation of cytosolic RNase activity by endogenous RNase inhibitor in rat vaginal epithelial cell on estradiol administration. *FEBS Lett.* 1994;343:11-14.

Rudolph-owens L, Hulboy DL, Wilson CL, Mudgett J, Matrisian LM. Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology.* 1997;138:4902-11.

Rugh R. The mouse – reproduction and development. Minneapolis: Burgess Publishing Company; 1968.

Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 1989;264:13369-72.

Ruscheinsky M, De la Motte C, Mahendroo M. Hyaluronan and its binding proteins during cervical ripening and parturition: dynamic changes in size, distribution and temporal sequence. *Matrix Biol.* 2008;27:487-97.

Russell DL, Doyle KMH, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem.* 2003b;278:42330-9.

Russell DL, Ochsner SC, Hsieh M, Mulders S, Richards JS. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology.* 2003a;144(3):1020-31.

Russo LA, Calabro SP, Filler TA, Carrey DJ, Gardner RM. In vivo regulation of syndecan-3 expression in the rat uterus by 17 β -E2. *J Biol Chem*. 2001;276:686-92.

Saceda M, Lindsey RK, Solomon H, Angeloni SV, Martin MB. Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *J Steroid Biochem*. 1998;66:113-20.

Sahlin L, Masironi B, Akerberg S, Eriksson H. Tissue- and hormone dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:47.

Salgado RM, Favaro RR, San martin S, Zorn TM. The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. *Anat Rec*. 2009a;292:138-53.

Salgado RM, Capelo LP, Favaro RR, Glazier JD, Aplin JD, Zorn TMT. Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009b;7(1):60.

Sanches JCT. Estudo ultraestrutural e imunohistoquímico do estroma uterino durante a gestação de camundongos deficientes em decorin [dissertação/dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

San Martin SA. Caracterização e distribuição de proteoglicanos da MEC do útero durante as fases iniciais da gestação em camundongos. Efeitos da castração e da reposição hormonal [tese/thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

San Martin S, Soto-Suazo M, Ferreira de Oliveira, S, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TMT. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. 2003a;125:585-95.

San Martin S, Soto-Suazo M, Zorn TMT. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. *Braz J Med Biol Res*. 2003b;36:SSN 0100-879X.

San Martin S, Soto-Suazo M, Zorn TMT. Perlecan and Syndecan-4 in uterine tissues during the early pregnancy in mice. *Am J Reprod Immunol*. 2004;52(1):53-9.

San Martin S, Zorn TMT. The small proteoglycan biglycan is associated with thick collagen fibrils in the mouse decidua. *Cell Mol Biol*. 2003;49(4):673-8.

Sasaki S, Nagata K, Kobayashic Y. Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into the vagina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382:35-40.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2223-33.

Schaefer L, Gröne HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, et al. Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney Int.* 2000;58:1557-68.

Schaefer L, Tsalastra W, Babelova A, Baliova M, Minnerup J, Sorokin L, et al. Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol.* 2007;170(1):301-15.

Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 2008;283(31):21305-9.

Schauer RC. Effects of estradiol and progesterone on rat uterine ribonuclease inhibitor activity. *Horm Metab Res.* 1991;23:162-5.

Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol.* 2003;13:366-75.

Schmalfeldt M, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR. Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem.* 1998;273:15758-64.

Sheng W, Dong H, Lee DY, Lu WY, Yang BB. Versican modulates gap junction intercellular communication. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):213-9.

Shinomura T, Zako M, Ito K, Ujita M, Kimata K. The gene structure and organization of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan. *J Biol Chem.* 1995;270:10328-33.

Schönherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin-mediated signal transduction in endothelial cells. Involvement of Akt/protein kinase B in up-regulation of p21(WAF1/CIP1) but not p27(KIP1). *J Biol Chem.* 2001;276(44):40687-92.

Shorr E. A new technique for staining vaginal smears: a single differential stain. *Science.* 1941;94:545.

Smith SE, French MM, Julian J, Paria BC, Dey SK, Carson DD. Expression of heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in the mouse blastocyst is regulated during normal and delayed implantation. *Dev Biol.* 1997;184(1):38-47.

Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(8):347-53.

Sonoda Y, Mukaida N, Wang JB, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, et al. Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol.* 1998;160(12):6159-65.

Spiess K, Zorn TM. Collagen types I, III, and V constitute the thick collagen fibrils of the mouse decidua. *Microsc Res Tech.* 2007;70:18-25.

Stumm CL. Caracterização imunohistoquímica de fibrilina-1 e TGF- β 1 no útero de camundongo ao longo do ciclo estral e a fase inicial da gestação [dissertação/dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Stumm CL, Zorn TM. Changes in fibrillin-1 in the endometrium during the early stages of pregnancy in mice. *Cells Tissues Organs*. 2007;185:258-68.

Svensson L, Aszódi A, Reinholt FP, Fässler R, Heinegard D, Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem*. 1999;274:9636-47.

Takata K, Teramaya H. Hormonal effect on glycosaminoglycans and glycoproteins in uteri of ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta*. 1977;500:333-43.

Tan J, Paria BC, Dey SK, Das SK. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology*. 1999;140(11):5310-21.

Teixeira V. Estroma endometrial de camundongos durante a “janela de implantação”. Análise por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão [dissertação/dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

Tenório DMH. Endométrio de camundongo durante a pré-implantação: estudo morfológico e localização imunocitoquímica de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. [dissertação/dissertation]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

Tibbitts TA, Mendoza-Meneses M, O'Malley BW, Conneely OM. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod*. 1998;59:1143-52.

Tong W, Pollard JW. Female sex steroid hormone regulation of cell proliferation in the endometrium. In: Glasser SR, Aplin JD, Giudice LC, Tabibzadeh S, editors. *The Endometrium*. London: Taylor and Francis; 2002. p. 94–109.

Tyree B, Halme J, Jeffrey JJ. Latent and active forms of collagenase in rat uterine explant cultures: regulation of conversion by progestational steroids. *Arch Biochem Biophys*. 1980;202(1):314–17.

Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*. 1984;222:587-97.

Vogel KG, Trotter JA. The effect of proteoglycan on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Collagen Relat Res*. 1987;7:105-14.

Westergren-Thorsson G, Norman M, Björnsson S, Endresen U, Stjernholm Y, Ekman G, et al. Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and

transforming growth factor-beta in the human cervix during pregnancy and involution. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1406:203-13.

White CA, Robb L, Salamonsen LA. Uterine extracellular matrix components are altered during defective decidualization in interleukin-11 receptor alpha deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:76.

Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:617-23.

Wood GA, Fata JE, Watson KLM, Khokha R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 2007;133:1035-44.

Wu F, Vij N, Roberts L, Lopez-Briones S, Joyce S, Chakravarti S. A novel role of the lumican core protein in bacterial lipopolysaccharide-induced innate immune response. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26409-17.

Wu WX, Zhang Q, Unno N, Derks JB, Nathanielsz PW. Characterization of decorin RNAm in pregnant intrauterine tissues of the ewe and regulation by steroids. *Am. J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C199-C206.

Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res*. 2005;15:483-94.

Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrate. *J Biol Chem*. 1989;264:8012-18.

Yang WC, Su TH, Yang YC, Chang SC, Chen CY, Chen CP. Altered perlecan expression in placental development and gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 2005;26:780–8.

Zachariae F. Autoradiographic (S-35) and histochemical studies of sulphomucopolysaccharides in the rabbit uterus, oviducts and vagina. *Acta Endocrinol*. 1958;29:118-34.

Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K, Kimata K. Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment region in mouse and human tissues. *J Biol Chem*. 1995;270:3914-18.

Zhang Y, Cao L, Yang BL, Yang BB. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem*. 1998;273:21342-51.

Zimmermann D. Versican. In: Iozzo R, editor. *Proteoglycans – Structure, Biology and Molecular Interactions*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000. p. 327-41.

Zorn TMT, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell Tissue Res*. 1986;244:443-8.

Zorn TMT. Células Deciduais. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB, editores. Células. São Paulo: Manole; 2005. p. 346-56.

Zorn TMT, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. Cell Mol Biol. 1995;41:97-106.

Zorn TM, Soto-Suazo M, Pellegrini CR, Oliveira JG, Stumpf WE. E2 receptor binding to the epithelium of uterine lumen and glands: region- and time-related changes during preimplantation and periimplantation periods studied by autoradiography. Histochem Cell Biol. 2003;120(1):1-12.