AMBART ESTER COVARRUBIAS CISTERNA

**ANÁLISE DA AÇÃO DO EMBRIÃO E DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NA
REGULAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE CÉLULAS DECIDUAIS: ESTUDO
*IN VIVO E IN VITRO***

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

São Paulo
2013

AMBART ESTER COVARRUBIAS CISTERNA

**ANÁLISE DA AÇÃO DO EMBRIÃO E DOS HORMÔNIOS OVARIANOS NA
REGULAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE CÉLULAS DECIDUAIS: ESTUDO
*IN VIVO E IN VITRO***

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma M.T. Zorn

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a. Vanessa M. Freitas

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Cisterna, Ambart Ester Covarrubias.

Análise da ação do embrião e dos hormônios ovarianos na regulação da matriz extracelular de células decíduais: estudo *in vivo* e *in vitro* / Ambart Ester Covarrubias Cisterna. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Telma Maria Tenorio Zorn.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da reprodução e matriz extracelular.

Versão do título para o inglês: Analysis of the action of the embryo and ovarian hormones is the regulation of extracellular matrix of decidual cells: *in vivo* and *in vitro* study.

1. Útero 2. Pseudogravidez 3. Deciduoma 4. Proteoglicanos
5. Colágenos 6. Hormônios Ovarianos I. Zorn, Profa. Dra. Telma Maria Tenorio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0122/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):   Ambart Ester Covarrubias Cisterna.

Título da Tese: Análise da ação do embrião e dos hormônios ovarianos na
regulação da matriz extracelular de células decíduais: estudo
in vivo e *in vitro*.

Orientador(a):   Profa. Dra. Telma Maria Tenorio Zorn.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a ...../...../....., considerou

(   ) **Aprovado(a)**

(   ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **075** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Telma Maria Tenório Zorn**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito dos hormônios ovarianos e fatores de crescimento sobre a expressão e síntese de moléculas da matriz extracelular por células decíduais e vias de sinalização envolvidas. Estudo in vitro*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ambart Covarrubias , Mariana de Castro Avila, Fernanda Barrence, Vanessa Moraes Freitas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **05.07.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 06 de julho de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ANA PAULA LEPIQUE
Secretário
CEUA – ICB/USP

À minha família, de maneira especial a minha mãe, Sara, e aos meus irmãos Tabita, Nazar e Simón.

AGRADECIMENTOS

Deleita-te também no SENHOR, e te concederá os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao SENHOR; confia nele, e ele o fará. (Salmos 37:4-5).

A aquele Ser do qual proveem a sabedoria, o conhecimento e a inteligência, no qual eu confio, agradeço sua bondade e misericórdia comigo em cada momento da minha vida.

À minha amada Mãe, **Sara Cisterna**, muito obrigada pela sua constante preocupação com minha vida. Aos meus irmãos, **Tabita Covarrubias**, **Nazar Covarrubias** e **Simón Covarrubias**, obrigada por acreditar em mim, pela amizade e apoio, vocês são minha motivação. Amada família, saibam que vocês desempenharam um papel essencial na formação de minha identidade. Obrigada por aceitar minha ausência e me entregar seu amor incondicional à distância.

A meus irmãos de fé, que me acolheram com muito amor na congregação em Tucuruvi, Ilha Bela, Rio Claro e Itaquaquecetuba, muito obrigada por suas atenções, que Deus abençoe a cada um de vocês.

A meu irmão e amigo **Germán Ibacache** e a sua esposa **Bernadita Quiroz** sou muito grata pela paciência, conselhos e agradáveis momentos compartilhados em companhia de seus filhos Jordan e Julia. A minha querida irmã e amiga **María Echeverría**, pela companhia, os conselhos e amor entregueado.

A minhas amigas de anos, **Alejandra Muñoz** e **Catalina Ureta**, agradeço porque, mesmo morando longe, vocês não deixaram que a distância atingisse nossa amizade, permitindo-me senti-lás bem perto de mim.

A meus amigos estrangeiros, tanto brasileiros quanto não brasileiros, agradeço pois, estando longe da minha pátria, cada um de vocês me ajudou de um ou outro modo a não me sentir sozinha e a reduzir as saudades da minha terra, obrigada por tudo, **Andrea Estevez**, **Ayrton Kondo**, **Cristina Cuartas**, **David Rincon**, **Felipe Daltoe**, **Fernanda Barrence**, **Juliane Sanches**, **Juliana Zanella**, **Manuel Gonzales**, **Tamara Coll**, **Tatiani Donato**, **Thaiomara Silva**, **Leonardo Alvez**, **Luis Pablo Tinajero**, **Rodrigo Barbano**, **Rodrigo Medeiros**, **Wilson Goês**.

Àquele homem, meu grande amigo, companheiro e parceiro no meu caminhar, **David Rincon**, agradeço por tornar mais divertido meus dias, obrigada por reforçar minha força vital dia a dia.

À **Profa. Telma Zorn**, minha orientadora e “avó científica”, sou muito grata por me acolher em seu laboratório sem sequer me conhecer direito, obrigada por ter acreditado em mim. Esses anos sob a sua orientação, ainda que não tão perto, porém nem tão longe, me fizeram uma mulher com um grande amor pela educação e pesquisa. A Senhora é meu exemplo de perseverança.

À **Profa. Vanessa Freitas**, minha co-orientadora e amiga, agradeço pela força dada, por me animar quando estava triste, por me mostrar que a perseverança e a paciência são fundamentais na pesquisa. Por fazer com que eu me sentisse bem, seus comentários me deixavam com um alto astral, as vezes estava tão cansada com os experimentos dando errado que suas palavras eram como um copo de água no deserto, obrigada por tudo.

Aos integrantes do LBR-MEC, **Cleusa Pelegrini**, colega que me permitiu ter um lugar confortável onde morar: **Fernanda Barrence**, minha querida amiga, importante companheira e colaboradora, sua ajuda foi essencial para mim como pessoa e também no meu trabalho. **Mariana Ávila**, filhinha que realizou sua iniciação científica no laboratório, me permitindo aprender a ensinar; **Marcela Gonçalves**, colega de atividades que me instruiu na minha chegada ao LBR; **Juliane Sanches**, amiga, companheira, obrigada pelos conselhos e por suas risadas animadoras; **Karina Lie**, minha primeira filhinha e importante colaboradora durante as etapas iniciais do projeto; **Renato Salgado**, colega, vizinho e colaborador científico, obrigada pela ajuda; **Rodolfo Favaro**, primeiro integrante do LBR-MEC que conheci, pessoa com a qual pude modelar meu espírito crítico na hora de desenvolver um trabalho científico. **Ayrton, Jeniffer, Joyce, Michele, Rafaela, Rafael**, coleguinhas que tornaram agradáveis minhas horas de trabalho de bancada. A todos os integrantes e colegas do LBR-MEC, lhes agradeço pela convivência e apoio dado a minha pessoa para a realização deste estudo. Em especial gostaria de agradecer a meus auxiliares nas redações e correções de minhas escritas, **Ayrton Kondo e Rafaela de Macedo**, muito obrigada pela paciência e boa disposição.

A todos os alunos e professores integrantes dos laboratórios onde tive a oportunidade de realizar parte de meus experimentos: Laboratório De Neurologia da Célula-tronco, Laboratório De Biologia da Célula Epitelial Mamária, Laboratório de Biologia de Matriz Extracelular, Laboratório De Biologia Tumoral. Obrigada pela boa disposição.

Ao **Professor Sebastián San Martín**, docente da Universidade de Valparaíso, ex-integrante do LBR-MEC e meu orientador durante a iniciação científica, sua ajuda foi muito importante para minha vinda ao Brasil, obrigada pela confiança depositada em mim. À profa. **Jimena Le Roy**, professora da Universidade de Valparaíso, por ter se preocupado em meu caminhar.

Ao **Professor Paulo Abrahamsohn**, prezado fundador do laboratório e da linha de pesquisa que desenvolvemos. Seus estudos serviram como base científica e para o desenvolvimento desta tese e meus trabalhos, obrigada pelos conselhos e os cafés compartilhados.

À **Professora Helena Nader**, a **Marcelo Lima** e sua equipe, suas experiências e conhecimentos foram importantes para o desenvolvimento deste estudo.

Ao professor **Áureo Yamada**, à **Profa. Estela Bevilacqua** e à professora **Marinilce Fagundes**, obrigada pelas sugestões e ensinamentos durante minha qualificação.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, e aos que ministraram disciplinas que cursei durante a pós-graduação, todos vocês foram importantes para a minha formação.

À **Regina Burbon**, secretaria substituta da pós-graduação, por sua competência e simpatia para auxiliar-me quando precisava algum documento. Obrigada pelo seu sorriso e boa disposição.

À **Thais Marques** e a minha querida **Sandra**, agradeço pelo fornecimento e intensiva dedicação ao cuidado com os animais que foram utilizados nesse estudo.

À **COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE CHILE (CONICYT)**, pelo suporte financeiro no desenvolvimento desse estudo, na forma de bolsa de doutorado. E ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dos projetos do LBR-MEC.

Omnia vincit Amor

RESUMO

Covarrubias CA. Análise da ação do embrião e dos hormônios ovarianos na regulação da matriz extracelular de células decíduais: Estudo *in vivo* e *in vitro*. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2013.

Durante a gestação, em várias espécies de mamíferos, os fibroblastos endometriais são alvos de profundas modificações morfofuncionais que levam a aquisição de um fenótipo epitelial e à expressão de novas moléculas, formando uma nova estrutura no útero denominada decídua. Em camundongos, a reação decidual pode ser estimulada artificialmente (na ausência de embrião), resultando na formação do deciduoma, um modelo de grande relevância para a identificação de fatores oriundos ou não do embrião necessários para a promoção da decidualização. A decidualização também promove uma profunda remodelação da matriz extracelular (MEC) do endométrio, e ambos os processos são fundamentais para o sucesso da gestação. Existem evidências, muitas das quais são oriundas dos estudos do Laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz extracelular (LBR-MEC), mostrando que a remodelação da MEC do útero não grávido é modulada pelos hormônios ovarianos estrógeno (E2) e progesterona (P4). Faltam, entretanto, na literatura, estudos consistentes sobre a regulação da MEC endometrial na ausência de sinais parácrinos provenientes do embrião. Além disso, não se conhece detalhes sobre a ação dos hormônios ovarianos sobre a produção de componentes da MEC por células decíduais. Nesse contexto, o presente estudo teve dois objetivos centrais: (i) caracterizar por imuno-histoquímica a composição e organização da MEC durante o desenvolvimento do deciduoma, (ii) estudar por qPCR, *Western blot*, e imunolocalização o efeito dos hormônios E2 e Medroxiprogesterona (MPA) na dinâmica da expressão de RNAm, síntese e secreção de moléculas da MEC em culturas primárias de células obtidas de deciduoma. Observamos que, a distribuição do colágeno tipo I, III, IV, V e dos proteoglicanos decorim, biglicam e versicam no deciduoma, foi semelhante ao já observado na decídua. As análises *in vitro*, mostram que o hormônio E2 aumenta a expressão gênica, a síntese e a deposição de decorim enquanto o MPA tem como alvo o biglicam. Ambos hormônios modulam a expressão de desmina, um marcador de decidualização. O presente estudo também mostra que o padrão de remodelação das moléculas alvo do presente estudo, é similar ao observado durante a decidualização da gestação normal. Conclui-se, portanto, que a remodelação da MEC é um evento intrínseco do processo de decidualização quer na gestação quer na pseudogestação. Ou seja, não foram identificadas diferenças que indicassem a existência de controle pelo embrião. Mostramos ainda que, *in vitro*, os hormônios E2 e MPA regulam de modo específico a expressão gênica e a secreção do proteoglicanos decorim e biglicam.

Palavras-chave: Útero. Pseudogravidez. Deciduoma. Colágenos. Proteoglicanos. Hormônios ovarianos.

ABSTRACT

Covarrubias CA. Analysis of the action of the embryo and ovarian hormones in the regulation of extracellular matrix of decidual cells: *In vivo* and *in vitro* study. [Ph.D. thesis (Tecidual and Cellular Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2013.

During pregnancy in several species of mammals, including humans and mice, endometrial fibroblasts undergo extensive morphofunctional changes acquiring an epithelial phenotype. Those new cells form a new structure in the uterus called decidua. In mice, the decidual reaction can be artificially induced in pseudopregnant females resulting in the formation of a structure morphologically similar to the decidua called deciduoma, a relevant model to study the putative role of the embryo upon decidualization. Endometrial decidualization is an essential event for the success of pregnancy. A notable remodeling of the extracellular matrix (ECM) organization and molecular composition occurs during this process. There are evidences, many of them coming from studies of the Laboratory of Reproductive and Extracellular Matrix Biology (LBR-MEC), that estrogen (E2) and progesterone (P4) modulate the remodeling of the uterine ECM. Nevertheless, there is no consistent information about the role, if it exists, of the embryo on the regulation of the endometrial ECM. Furthermore, it was not yet clarified how the ovarian hormones act on the production of ECM components by decidual cells. Thus, the objective of present study was to identify the composition and organization of the ECM during the development of the mouse deciduoma; and to study by qPCR, Western blot and immunolocalization methods, the effect of hormones E2 and medroxyprogesterone (MPA) on synthesis and secretion of ECM molecules by primary cultures of mouse decidual cells obtained from deciduoma. We found that the distribution of collagen types I, III, IV, V and proteoglycans decorin, biglycan and versican in deciduoma, was similar to that previously observed in the decidua. The *in vitro* assays showed E2 increases the gene expression for the core protein of decorin, while MPA increases the expression of the core protein of biglycan. In addition, was observed that both hormones increase the expression of desmin a marker of decidualization. These results showed that in the endometrium of both pregnant and pseudopregnant animals ECM molecules such as collagens and proteoglycans are similarly modulated by ovarian hormones. At from the present study we may conclude that ECM remodeling is an intrinsic event that happens during decidualization modulated by E2 and MPA and this modulation independent of the presence of the embryo in the uterus. In addition we showed that in decidual cells *in vitro* the gene expression and the secretion of proteoglycans decorin and biglycan are differentially regulated by hormones E2 and MPA.

Key-words: Uterus. Pseudopregnancy. Collagens. Proteoglycans. Ovarian hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de uma secção transversal do útero de camundongo no 7º dia de gestação.....	27
Figura 2 - Fotomicrografia da decídua (A) e deciduoma (B) de camundongos, em corte transversal, no 7º dia após coito.....	29
Figura 3 - Representação esquemática da organização estrutural do colágeno fibrilar (A). Eletromicrografia mostrando fibrilas de colágeno, observadas no microscópio eletrônico de transmissão (B).....	31
Figura 4 - Esquema da região de ligação dos glicosaminoglicanos ao esqueleto proteico.....	33
Figura 5 - Representação esquemática de alguns SLRPs.....	34
Figura 6 - Representação esquemática de vesículas com proteoglicanos de alto peso molecular.....	37
Figura 7 - Esquema da organização estrutural dos receptores nucleares esteroides.....	41
Figura 8 - Esquema do modelo clássico de ação dos receptores esteroides.....	43
Figura 9 - Esquema do mecanismo de ação dos esteroides ligando independente o “cross-talk”.....	44
Figura 10 - Esquema da regulação dos receptores esteroides que perdem a via HERs “Thethering”.....	45
Figura 11 - Imunofluorescência do colágeno tipo I na decídua antiometrial.....	73
Figura 12 - Imunofluorescência do colágeno tipo III na decídua antimesometrial.....	75
Figura 13 - Imunofluorescência do colágeno tipo IV na decídua antimesometrial..	76
Figura 14 - Imunofluorescência de colágeno tipo V na decídua antimesometrial.....	78

Figura 15 - Imunoperoxidase para localização de decorim na decídua antimesometrial.....	79
Figura 16 - Imunoperoxidase para identificação de biglicam na decídua antimesometrial.....	80
Figura 17 - Imunoperoxidase para versicam na decídua antimesometrial.....	82
Figura 18 - Imunoperoxidase para versicam na decídua antimesometrial.....	83
Figura 19 - Esfregaços vaginais de camundongos fêmeas grávidas e pseudográvidas do 2º ao 8º dia pós-coito.....	86
Figura 20 - Ovários de fêmeas grávidas e pseudográvidas do quinto ao oitavo dia pós-coito.....	87
Figura 21 - Representação esquemática do procedimento para o isolamento de células decidualizadas do deciduoma de sétimo dia, e posterior processamento.....	89
Figura 22 - Ensaio de MTT para determinação da dose de hormônio adequado para tratamento das células deciduais <i>in vitro</i>	90
Figura 23 - Morfologia das células deciduais tratadas com E2 e MPA por 24, 48 e 72 h <i>in vitro</i>	92
Figura 24 - Imunofluorescência para desmina em células deciduais cultivadas sem tratamento hormonal.....	93
Figura 25 - Imunofluorescência para desmina em células deciduais cultivadas em lamínulas de vidro e tratadas com E2 e MPA por 24, 48 e 72 h.....	94
Figura 26 - Quantificação da porcentagem de área celular imunofluorescente para desmina nas células deciduais cultivadas <i>in vitro</i> e tratadas com os 10 µg/mL de E2 e 5 mg/mL de MPA.....	95
Figura 27 - Imunofluorescência para Vimentina nas células cultivadas <i>in vitro</i>	96
Figura 28 - Imunofluorescência para os receptores hormonais nas células deciduais antimesometriais cultivadas <i>in vitro</i>	97

Figura 29 - Expressão gênica de BGN estimada em relação à expressão de GAPDH por qPCR em células tratadas por E2 ou MPA por 24, 48 ou 72 horas.....	98
Figura 30 - Expressão gênica de DCN estimada em relação à expressão de GAPDH por qPCR em células decíduais tratadas com E2 ou MPA por 24,48 ou 72 horas.....	99
Figura 31 - Curvas de dissociação representativas das amostras de cultura de células. Biglicam (A) Decorim (B) e GAPDH (C).....	100
Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose de condroitim sulfato e dermatam sulfato submetidos à degradação com condroitinase ABC.....	101
Figura 33 - Western blot representativo da avaliação da função das enzimas.....	102
Figura 34 - Western blot representativo da presença de biglicam (BGN) no meio condicionado de células decíduais tratadas por 24, 48 e 72 com estrógeno (E2) e medroxiprogesterona (MPA).....	103
Figura 35 - Western blot representativo da presença de decorin (DCN) no meio condicionado de células decíduais tratadas por 24, 48 e 72 com hormônios estrógeno e medroxiprogesterona.....	104
Figura 36 - Imunofluorescência para biglicam em células decíduais tratadas com E2 e MPA por 24 h, 48 h e 72 h e cultivadas em lamínulas de vidro.....	105
Figura 37 - Porcentagem de área celular imunofluorescente para biglicam nas células decíduais cultivadas in vitro e tratadas com 10 µg/mL de E2 ou 5 mg/mL de MPA.....	106
Figura 38 - Imunofluorescência para decorim nas células decíduais tratadas com E2 e MPA por 24 h, 48 h e 72 h.....	107
Figura 39 - Porcentagem de área celular imunomarcada para decorim nas células decíduais cultivadas in vitro e tratadas com 10 µg/mL de E2 ou 5 mg/mL de MPA.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	RT Master mix: 50 µl volume final da reação.....	66
Tabela 2 -	Programa utilizado para qPCR.....	66
Tabela 3 -	PCR configuração cocktail.....	67
Tabela 4 -	Concentrações dos componentes para uma reação.....	67
Tabela 5 -	Sequência dos primers, suas temperaturas de anelamento (T) e dimensões do produto esperado.....	69
Tabela 6 -	Distribuição dos colágenos e proteoglicanos no decíduoma.....	84
Tabela 7 -	Análise quantitativa dos corpos lúteos.....	87
Tabela 8 -	Porcentagem de células deciduais antimesometriais positivas para a marcação de receptores hormonais.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** - Albumina de soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)
- DA**- Decídua antimesometrial
- DAB** - 3,3-diaminobenzidina
- DAPI** - 4,6 diamino 2-fenil-indol (do inglês *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*)
- DCN**– Decorim
- dg** - Dia de gestação
- DM** - Decídua mesometrial
- DMEM** – Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DNT** - Domínio N-terminal
- PDA** - Tampão 1,3 diamino propano acetato
- dpg** - Dia de pseudogestação
- E2**– Estrógeno
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EGTA** - Ácido tetracético etilenoglicol (do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*)
- EGFR** - Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *epidermal growth factor receptor*)
- ER- α** - Receptor de estrógeno- α (do inglês *estrogen receptor- α*)
- ER- β** - Receptor de estrógeno- β (do inglês *estrogen receptor- β*)
- END** - Estroma não decidualizado
- FACITs** - Colágenos associados a fibrila com triple hélice interrompida (do inglês *fibril-associated collagen with interrupted triple hélices*)
- FGF** - Fator de crescimento fibroblástico (do inglês *fibroblast growth factor*)
- FITC** - Isotiocianato de fluoresceína, (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)
- FRA-1** - Antígeno 1 relacionado a FOS (do inglês *fos-related antigen 1*)
- GAGs** - Glicosaminoglicanos
- HA** - Ácido hialurônico (do inglês *hyaluronic acid*)
- HB-EGF** - Fator de crescimento epidermal ligado à heparina (do inglês *heparin-binding epidermal growth factor*)
- HCl** - Ácido clorídrico
- HE** - Hematoxilina –Eosina

HREs - Elementos responsivos a hormônios (do inglês *hormone response elements*)

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂Od - Agua destilada

IGF-RI - Fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (do inglês *Insulin-like growth factor 1*)

LUM - Lumicam

MACITs - Colágenos associados a membrana com triple hélice interrompida (do inglês *membrane-associated collagen with interrupted triple helices*)

MEC - Matriz extracelular

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

ME - Camada muscular longitudinal externa

MI - Camada muscular circular interna

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2, S-difeniltetrazolium brometo)

MULTIPLEXINS - Múltiplos domínios de triple hélice e interrupções. (do inglês *multiple triple helix domains and interruptions*)

MMPs - Metaloproteinases da matriz (do inglês *matrix metalloproteinases*)

NKu - Linfócitos *natural killer* uterinos

P4 - Progesterona

PR-A - Receptor de progesterona isoforma A (do inglês *progesterone receptor A*)

PR-B - Receptor de progesterona isoforma B (do inglês *progesterone receptor B*)

PR-C - Receptor de progesterona isoforma C (do inglês *progesterone receptor C*)

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RDM - Região decídua madura

RN - Receptores nucleares

PGs - Proteoglicanos

RPD - Região pré-decídua

SDS - Dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)

SLRPs - Pequenos proteoglicanos ricos em leucina (do inglês *small leucine-rich proteoglycans*)

PBS - Tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

TLR - Receptores do tipo Toll (do inglês *toll like receptors*)

TTBS - Tampão salino-Tris com Tween 20 (do inglês *Tris-Buffered Saline and Tween 20*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Gestação e Formação da Interface Materno-Fetal.....	22
1.1.2 <i>Implantação</i>	22
1.1.3 <i>Decidualização Induzida</i>	28
1.2 A Matriz Extracelular	29
1.2.1 <i>Colágenos</i>	30
1.2.2 <i>Proteoglicanos</i>	32
1.2.3 <i>Matriz extracelular do Útero</i>	38
1.3 Os Hormônios Esteróides Ovarianos e Seus Receptores	40
1.3.1 <i>Estrutura dos Domínios dos receptores nucleares</i>.....	40
1.3.2 <i>Mecanismos de ação dos receptores</i>	43
1.3.3 <i>Receptores de estrógeno no útero de camundongos fêmeas</i>	45
1.3.4 <i>Os Receptores de progesterona no útero de fêmeas de camundongos</i>...	47
1.4 Cultivos de células decíduais antimesometriais.	48
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 Objetivos Gerais.....	52
2.2 Objetivos Específicos	52
3 MATERIAIS & MÉTODOS	53
3.1 Animais	55
3.2 Esfregaço Vaginal	55
3.3 Procedimentos para a Vasectomia	56
3.4 Indução da pseudogravidez	56
3.4.1 <i>Indução da decidualização</i>	56
3.5 Coleta de decíduomas e ovários.....	57
3.5.1 <i>Processamento para microscopia de Luz</i>.....	57
3.5.2 <i>Processamento dos ovários</i>.....	57
3.5.3 <i>Imunofluorescência</i>.....	57
3.5.4 <i>Imunoperoxidase</i>.....	58
3.6 Culturas de Células	59
3.6.1 <i>Obtenção de células decíduais</i>	59
3.6.2 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	61

3.6.3 Curva de crescimento	61
3.6.4 Meios suplementados com hormônios	62
3.7 Imunofluorescência	62
3.7.1 Imunofluorescência para detecção dos filamentos intermédios desmina e vimentina.....	62
3.7.2 Imunofluorescência para detecção dos receptores hormonais receptor de estrógeno (ER- α) e receptor de progesterona (PR).....	63
3.7.3 Imunofluorescência para detecção dos proteoglicanos decorim e biglicam	64
3.8 Reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR)	64
3.8.1 Lise das células.....	65
3.8.2 Transcrição reversa (RT)	65
3.8.3 PCR em tempo real.....	66
3.8.4 Análises estatísticas para qPCR.....	68
3.9 Western blot.....	68
3.9.1 Extração dos proteoglicanos	68
3.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	69
3.9.3 Immunoblot.....	69
3.9.4 Análise Estatística.....	70
4 RESULTADOS.....	71
4.1 Caracterização da matriz extracelular do decíduoma durante seu desenvolvimento.	72
4.1.2 Colágeno tipo I	72
4.1.3 Colágeno tipo III	74
4.1.4 Colágeno tipo IV	74
4.1.5 Colágeno tipo V.....	77
4.1.6 Decorim.....	77
4.1.7 Biglicam	77
4.1.8 Versicam no decíduoma	80
4.1.9 Distribuição de versicam na decídua.	81
4.2 Análise do perfil hormonal durante a gestação e pseudogestação em camundongos.....	84
4.2.1 Esfregaço vaginal.....	84
4.2.2 Análise do corpo lúteo.....	85

4.3 Estabelecimento de culturas primárias de células decíduais do endométrio de camundongos fêmeas.	87
4.3.1 Cultura primária de células decíduais antimesometriais de camundongos cultivadas em meios suplementados com hormônios	88
4.3.2 Teste de viabilidade porMTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).....	89
4.3.3 Caracterização das culturas de células decíduais antimesometriais.....	91
4.4 Efeito dos hormônios ovarianos nas células decíduais antimesometriais de decíduoma sobre a expressão de moléculas da MEC.	98
4.4.1 Biomodulação da expressão gênica do BGN e DCN em células decíduais antimesometriais tratadas com o MPA e 17β-Estradiol.....	98
4.4.2 Biomodulação da secreção do BGN e DCN por células decíduais antimesometriais de decíduoma tratadas com 17β-Estradiol ou MPA.....	100
4.4.3 Imunolocalização dos SLPRs nas células decíduais antimesometriais de decíduoma tratadas com hormônios.....	104
5 DISCUSSÃO	110
5.1 Distribuição de moléculas da MEC na decídua e no decíduoma	111
5.1.1 Os Proteoglicanos.....	111
5.1.2 Os Colágenos	114
5.2 Sínteses e secreção de moléculas da MEC por células de decíduoma cultivadas na presença e ausência de E2 e MPA	116
5.2.1 Efeito do estrógeno nas células decíduais	118
5.2.1 Efeito da MPA nas células decíduais.....	119
6 CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO A - Colágenos nos vertebrados.....	136
ANEXO B - Classificação dos proteoglicanos da matriz intersticial	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gestação e Formação da Interface Materno-Fetal

A gestação em mamíferos promove importantes modificações no ambiente uterino preparando-o para receber o embrião e provê-lo das condições necessárias ao seu desenvolvimento. A gestação é um processo complexo que compreende uma série de eventos que incluem: *i)* implantação; *ii)* decidualização; *iii)* placentação *iv)* e, finalmente, o nascimento da prole por meio do parto. O sucesso de cada evento é essencial para que se avance ao estágio seguinte (Cha et al., 2012; Zhang et al., 2013).

1.1.2 Implantação

A implantação é o processo pelo qual o blastocisto adquire uma posição fixa no interior do útero, que requer uma íntima interação com o epitélio uterino. A implantação foi classificada em três fases morfológica e temporalmente distintas: *i)* a aposição; *ii)* a adesão do embrião à superfície do epitélio luminal e, finalmente, *iii)* a invasão do endométrio pelo embrião (Revisado em: Abrahamsohn, Zorn, 1993; Favaro et al., no prelo; Schlafke, Enders, 1967). Em mamíferos, especialmente em roedores, ocorre a formação de um edema generalizado no endométrio imediatamente antes do início da aposição. Este evento leva ao fechamento do lúmen uterino formando a cripta de implantação e, paralelamente, favorece a interação das microvilosidades do trofoectoderma com as do epitélio luminal (aposição), seguido pelo contato íntimo entre eles (adesão). De acordo com as diferentes interações do blastócito com o útero, a implantação tem sido classificada em três categorias: *i)* central; *ii)* excêntrica; *iii)* intersticial. A implantação central acontece em mamíferos como coelhos, furões, e alguns marsupiais. Nestes animais, o blastocisto cresce e se expande amplamente antes da implantação. Em contraste, os blastocistos de camundongos, ratas, e hamsters são pequenos e apresentam uma expansão modesta. Nestas últimas espécies, a câmara de implantação é formada pela invaginação do epitélio uterino, o que é característico da implantação excêntrica. Em porcos da Índia, chimpanzés e humanos, o processo de implantação é do tipo intersticial, no qual o blastocisto é embebido dentro do estroma subepitelial (Revisado em: Dey et al., 2004; Zhang et al., 2013).

A reação de adesão coincide com um aumento da permeabilidade vascular, que nessa fase, é localizada especificamente ao redor dos blastocistos, o que pode ser demonstrado pela injeção do corante vital azul de tripan (Psychoyos, 1973). O período de implantação do blastocisto varia de acordo com a espécie de animal, ocorre no 4º dia em camundongos, no 5º dia em ratos, e aproximadamente no 8º em humanos. (Enders, Schlafke, 1986). Para que a implantação tenha sucesso, é preciso que o endométrio esteja receptivo ao embrião e, ao mesmo tempo, que o embrião esteja em estado de desenvolvimento e ativação adequados. A implantação ocorre em um período determinado de tempo durante o qual o blastocisto, quando competente, interage, com o endométrio receptivo associando-se a ele. Esse período é conhecido como “janela de implantação”. A implantação embrionária em roedores envolve interações moleculares complexas entre o embrião e as células uterinas, sendo a decidualização um evento essencial para que esse processo ocorra.

Os eventos acima descritos são primariamente coordenados pelos hormônios ovarianos estrógeno (E2) e progesterona (P4), porém, o diálogo molecular que se gera localmente, no ambiente uterino, particularmente, entre a mãe e o embrião ou vice-versa, não é ainda totalmente compreendido. Em camundongos e ratos, a ação coordenada de E2 e P4 regula a proliferação e/ ou diferenciação das células do epitélio e do estroma uterino de modo a estabelecer a “janela de implantação”. No 1º dia de gestação (dg) em camundongos (dia em que se observa a rolha vaginal), as células do epitélio uterino proliferam por influência do E2 pré-ovulatório. O incremento dos níveis de P4, provenientes do corpo lúteo recém-formado, desencadeia a proliferação de células do estroma, a partir do 3º dg. Ao mesmo tempo, o P4 inibe a proliferação do epitélio luminal. A proliferação das células do estroma é adicionalmente estimulada pela ação de baixos níveis de E2 ovariano secretado na manhã do 4º dg. Além disso, esse E2 atua na aquisição da receptividade uterina permitindo a implantação. Em resumo, as ações coordenadas de P4 e E2 resultam na suspensão da proliferação do epitélio uterino ao mesmo tempo em que iniciam a diferenciação das células do estroma. Durante a gestação em roedores, o contato do blastocisto com o epitélio uterino, diferenciado por P4 e E2, atua como estímulo para o desencadeamento da reação decidual, processo também denominado de decidualização. O perfil hormonal de camundongos fêmeas pseudográvidas (acasalados com machos inférteis), é similar àquele de fêmeas

grávidas devido à manutenção dos corpos lúteos nesses animais pseudográvidos. Portanto, a sensibilidade do útero pseudográvido à implantação é similar àquela da gestação normal, de forma que blastócitos transferidos durante a fase receptiva no 4º dia de pseudogestação (dpg) geram uma implantação normal e subsequente decidualização. Embora o blastocisto seja o indutor normal da decidualização em camundongos, vários estímulos não específicos, como injeção intraluminal de óleo, ar, polissacarídeos e estímulos mecânicos, podem também iniciar a reação decidual em úteros animais pseudográvidos ou preparados adequadamente por hormônios ovarianos (Abrahamsohn, Zorn, 1993; Dey et al., 2004; Finn, Martin, 1974; Herington et al., 2009).

1.1.1 Decidualização

A decidualização corresponde a uma série de modificações morfológicas e funcionais no ambiente uterino preparando-o para receber o embrião e provendo-o das condições necessárias para o seu desenvolvimento. A decidualização gera uma nova estrutura transitória chamada decídua, que se caracteriza pela proliferação e transdiferenciação dos fibroblastos endometriais em células com fenótipo epitelióide, denominadas células deciduais.

A decídua é uma estrutura privilegiada que, entre outras funções, evita que o embrião semi-alógeno geneticamente “diferente da mãe”, seja rejeitado pelo sistema imune materno. Sabe-se que a decídua madura, atua como uma barreira física para restringir o acesso de células imunes maternas (Wang et al., 2004). Além de atuar como barreira física, as células deciduais são capazes de inibir a expressão de quimiocinas por mecanismos epigenéticos de metilação do DNA, restringindo o acesso de linfócitos T à interface materno-fetal (White et al., 2002).

Tanto a implantação como a decidualização são eventos orquestradas pelos hormônios esteroides ovarianos E2 e P4 e dependentes de interações complexas e recíprocas entre fatores de transcrição, morfógenos, citocinas, reguladores do ciclo celular e vias de sinalização (Revisado em: Cha et al., 2012; Dey et al., 2004; Zhang et al., 2013).

A decidualização em roedores é restrita ao endométrio que circunda cada um dos embriões. Estes locais denominados sítios de implantação e são intercalados por sítios de interimplantação nos quais o endométrio permanece inalterado, não

sofrendo a decidualização. Os cornos uterinos dos camundongos podem ser divididos em duas regiões, a mesometrial e a antimesometrial. Essa divisão espacial tem como referência o mesometrio, um ligamento muito vascularizado que prende os cornos uterinos à parede abdominal. Cada região possui características próprias, funções e destinos diferentes durante a gestação. A decídua antimesometrial dá suporte ao embrião durante os estágios iniciais da gestação, formando a placenta corio-vitelínica, que contribui para a formação da placenta corio-alantóica definitiva. A decídua antimesometrial involui à medida que a decídua mesometrial se desenvolve (Abrahamsohn, Zorn, 1993; Abrahamsohn et al., 2002; Favaro et al., no prelo).

O epitélio uterino luminal é requerido para indução da decidualização (Lejeune et al., 1981) e serve como um transdutor de sinais para o endométrio. Após a adesão do blastocisto, as células do epitélio luminal que rodeiam o blastócito, sofrem apoptose (Parr et al., 1987; Welsh, Enders, 1985) facilitando a invasão do embrião e seu acesso ao suprimento sanguíneo contido no endométrio (Parr et al., 1987).

A decidualização do endométrio inicia-se no estroma subjacente ao epitélio que reveste a cripta de implantação do embrião, e progride, em direção centrífuga, para as porções mais profundas do estroma, ocupando a maior parte da região antimesometrial. A partir do sétimo dia da gestação em camundongos, a decídua mesometrial inicia seu desenvolvimento. A formação da decídua é um processo de grande dinamicidade que ocorre em um espaço de tempo notavelmente curto. Pelo processo de decidualização, os fibroblastos endometriais que estão rodeando a cripta de implantação, onde se encontra blastocisto, proliferam e transdiferenciam em células denominadas deciduais, originando um órgão, que embora transitório, é essencial para a implantação e o desenvolvimento do conceito. Esta transdiferenciação dos fibroblastos endometriais em células deciduais é um processo de transição mesênquima-epitelial, no qual as células adquirem um fenótipo epitelial. A decidualização de fibroblastos endometriais envolve reestruturação do citoesqueleto e uma intensa remodelação da matriz extracelular (MEC) (Abrahamsohn, Zorn, 1993; Abrahamsohn et al., 2002; Favaro et al. no prelo).

Em roedores, muitas das células decíduais sofrem endoduplicação, um processo pelo qual as células passam por ciclos de replicação do DNA sem, entretanto, realizarem a citocinese. A endoreduplicação pode servir para dar suporte ao crescimento do embrião, aumentando a síntese de proteínas por meio de transcrição de um maior número de genes (Cha et al., 2012).

A decidualização gera uma mudança profunda no arranjo do estroma endometrial que muda de um tecido conjuntivo frouxo, para uma estrutura com um arranjo epitelióide cujos espaços extracelulares são expressivamente reduzidos. Embora os fibroblastos do estroma endometrial sejam morfológicamente semelhantes àqueles dos outros tecidos conjuntivos, diferem daqueles, por possuírem a capacidade de se transdiferenciar em células decíduais, quando devidamente estimulados pelos hormônios ovarianos E2 e P4.

As células decíduais maduras são volumosas, poliédricas, polinucleadas e justapostas, possuindo características tipicamente epitelióides.

O processo de decidualização da região antimesometrial do útero, é extremamente dinâmico, levando ao estabelecimento de diferentes compartimentos no endométrio. Inicialmente, a diferenciação dos fibroblastos localizados nas proximidades do epitélio luminal forma uma região avascular, chamada de decídua primária. As células subjacentes continuam proliferando e se diferenciando formando a decídua secundária, que em contraste, é uma região bem vascularizada. Nos artigos de nosso laboratório essa região é denominada de decídua madura. Como o processo de decidualização é extremamente dinâmico, concomitantemente com a formação da decídua madura, observa-se a formação da região de células pré-decíduais, constituída por células que apresentam características intermediárias entre as células decíduais maduras e os fibroblastos endometriais. A última região da decídua situa-se nas imediações do miométrio, e é constituída por células que permanecem morfológicamente semelhantes aos fibroblastos, denominada região do estroma não decidualizado. Existem evidências de que esta estreita camada de células que não sofre o processo de decidualização, contenha populações de células pluripotentes do endométrio e, portanto, participe da reconstrução do endométrio no período pós-parto (Kleinfeld, O'Shea, 1983) (Figura 1). A decídua é essencial, para proporcionar uma barreira que impede a invasão descontrolada do trofoblasto, protegendo o embrião da rejeição materna além de prover nutrientes

para o embrião em desenvolvimento antes da formação da placenta (Abrahamsohn, Zorn, 1993).

As células decidualizadas passam a expressar, além da proteína vimentina característica de fibroblastos, também a proteína desmina. Essa descoberta feita por Glasser, Julian, (1986) fez da desmina um marcador da decidualização. A distribuição da desmina muda conforme a diferenciação das células deciduais avança. Inicialmente se observa uma distribuição perinuclear a qual progressivamente se espalha pelo citoplasma, concentrando-se na periferia celular, até desaparecer no 9º dg, quando a decídua antimesometrial encontra-se em processo de involução (Oliveira et al., 2000).

Figura 1 - Esquema de uma secção transversal do útero de camundongo no 7º dia de gestação.

O embrião (E) localiza-se na região antimesometrial da cripta de implantação. A região antimesometrial mostra três regiões: região de células deciduais maduras (MD), região de células pré-deciduais (PD), e uma região de estroma não decidualizado (ND) localizada na interface com o miométrio (M), luz uterina (L). A linha pontuada separa a região mesometrial da antimesometrial.

Fonte: Adaptado de: Spiess e Zorn (2007).

1.1.3 Decidualização Induzida

Em humanos, sob a influência da P4 produzida na fase progestacional o endométrio sofre um processo de pré-decidualização a cada ciclo sexual, contudo, a manutenção e o desenvolvimento completo da decidualização só serão sustentados pela implantação do embrião. Se esta não acontece, o endométrio é liberado durante menstruação. Diferentemente, em roedores, a decidualização requer, além de níveis adequados de E2 e P4, um gatilho exógeno dado pelo contato do blastocisto com o epitélio luminal do endométrio ou ainda por meio de estimulação artificial na superfície luminal do epitélio uterino. O estímulo artificial mais usado para a promoção da decidualização é a injeção de uma pequena quantidade de óleo, ou polissacarídeos no lúmen uterino (Andrade, 1993; Herington et al., 2009). A decidualização consequente da implantação embrionária formará a decídua enquanto aquela resultante de estímulo artificial é denominada de decíduoma (Loeb, 1908) (Figura 2). O tecido decidual de ambos, decídua e decíduoma, apresenta características morfológicas e funcionais similares. Portanto, o decíduoma representa um modelo valioso para se analisar a decidualização sem a influência do embrião. Da mesma forma, por não conter células embrionárias, o decíduoma tem sido amplamente utilizado como modelo de estudo, particularmente, como fonte de células deciduais em estudos *in vitro* (Gu, Gibori, 2006). Mesmo sendo a morfologia geral do decíduoma muito semelhante à da decídua, alguns estudos mostram que seu desenvolvimento é mais acelerado do que aquele observado na decídua, sugerindo que o embrião, embora não tenha um papel imprescindível no desencadeamento da reação decidual, poderia exercer algum papel no controle do desenvolvimento da decidualização (Andrade, 1993; Lassance, 1998). Contudo, é importante ressaltar que a aceleração e exuberância no desenvolvimento dependem do tipo de estímulo utilizado para induzir a decidualização (Herington et al., 2009). A decidualização tanto induzida como fisiológica, gera uma nova arquitetura celular com fenótipo epitelíóide acompanhado por redução dos espaços intercelulares, promovendo, conseqüentemente, uma marcante remodelação dos componentes da matriz extracelular (MEC) (Abrahamsohn, Zorn, 1993; Abrahamsohn et al., 2002; Zorn, 2005; Favaro et al., no prelo).

Figura 2 - Fotomicrografia da decídua (A) e deciduoma (B) de camundongos, em corte transversal, no 7º dia após coito.

Evidencia-se a decídua mesometrial (DM), decídua antimesometrial (DA), embrião (E), miométrio (M) e mesométrio (ME). Hematoxilina- Eosina. Escala de barra: 500 µm.

Fonte: Arquivo pessoal

1.2 A Matriz Extracelular

A MEC é um conjunto de moléculas versáteis que são secretadas pelas células, organizadas e imobilizadas no espaço extracelular, numa íntima associação com a superfície das células que as produzem (Hynes, 2009; Berrier, Yamada, 2007). A MEC integra as células e as contextualiza ao seu microambiente, ajuda na organização dos tecidos e coordena diversos processos biológicos fundamentais para as células como: crescimento, proliferação, expressão gênica, diferenciação e migração celular. Muitas das funções da MEC requerem receptores de adesão transmembrana, que fazem a ligação entre o meio extracelular e o citoplasmático, pois de um lado esses receptores se ligam aos componentes da MEC e por outro interagem, com vias de sinalização e proteínas adaptadoras, que regulam o citoesqueleto (Hynes, 2009; Lodish, 2000). Além disso, os componentes da MEC possuem a capacidade de ligação a fatores de crescimento, controlando assim a sua disponibilidade no microambiente celular (Hynes, 2009).

Os principais componentes da MEC são: i) colágenos; ii) componentes do sistema elástico; iii) glicosaminoglicanos; iv) proteoglicanos e v) glicoproteínas adesivas.

1.2.1 Colágenos

Os colágenos representam a família de proteínas mais abundantes da MEC. Até o presente momento, foram descritos 28 tipos distintos de colágenos, compostos ao menos de 46 cadeias polipeptídicas distintas identificadas em vertebrados (Shoulders, Raines, 2010). A característica que define os colágenos corresponde a uma estrutura helicoidal de tripla hélice alfa, na qual três cadeias polipeptídicas se entrelaçam umas nas outras como uma corda. As três cadeias polipeptídicas podem ser idênticas (homotriméricos) ou distintas (heterotriméricos), sendo as heterotrimétricas mais frequentes. As propriedades de cada tipo de colágeno são devidas também, em grande parte, a segmentos que interrompem a tripla hélice e que se dobras em outros tipos de estrutura tridimensional.

A estrutura helicoidal tríplice do colágeno é devida a uma abundância incomum de três aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina (formada pela conversão de prolina). Estes aminoácidos formam uma sequência característica Gly-Pro-X, em que cada X pode ser qualquer aminoácido. A cadeia lateral de glicina é a única que pode adaptar-se no centro aglomerado de uma hélice de três filamentos, capacitando a cada cadeia de polipeptídios a dobrar-se numa hélice (Figura 3) (Revisado em Alberts, 2007; Lodish, 2000; Shoulders, Raines, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da organização estrutural do colágeno fibrilar (A). Eletromicrografia mostrando fibrilas de colágeno, observadas no microscópio eletrônico de transmissão (B).

As fibrilas de colágeno estão em um corte longitudinal (L) e em um transversal (T).

Fonte: Adaptado de: Junqueira e Carneiro, 2008.

Os colágenos estão agrupados em diferentes categorias, incluindo os colágenos clássicos formadores de fibrilas (colágeno tipo I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) e os colágenos formadores de redes (colágeno tipo IV, VI, VIII, X). Existem também os FACITs (colágenos associados a fibrilas com triple hélice interrompida), MACITs (colágenos associados a membrana com triple hélice interrompida) e MULTIPLEXINs (multiplex domínios tríplice hélice e interrupções). Os diferentes tipos de colágenos são listados no **Anexo A** (Shoulders, Raines, 2010).

A formação das fibrilas de colágeno ou fibrilogênese é um processo complexo que envolve a associação de tipos diferentes de colágeno e o processamento enzimático, sendo que alterações nestes fatores podem comprometê-la. Neste processo destaca-se também a participação de outro grupo de moléculas da família dos proteoglicanos (PGs), denominados de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs do inglês *small leucine-rich proteoglycans*), apresentados em detalhe na próxima seção. Os SLRPs possuem a capacidade de interagir com as moléculas de colágeno regulando a agregação lateral das fibrilas de colágeno e, dessa forma, regulando a sua espessura.

1.2.2 *Proteoglicanos*

Os PGs correspondem a uma família de macromoléculas amplamente distribuídas na MEC. Estas macromoléculas complexas são constituídas por um eixo proteico central ao qual se ligam, covalentemente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares que apresentam como estrutura básica repetições de unidades dissacarídicas. Estas unidades dissacarídicas são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e por um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou ainda um açúcar neutro (galactose), unidas entre si por ligações glicosídicas. Os monossacarídeos podem estar esterificados com grupos sulfato, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos conferem alta densidade de cargas negativas a estes polímeros (Revisão em: Iozzo 1998; Jackson et al., 1991; Kjeu, Lindahl, 1991). Os GAGs resultantes são: condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e queratam sulfato, heparina e ácido hialurônico (HA). O GAG HA é o único não sulfatado e que não forma proteoglicanos. Nos tecidos, os GAGs encontram-se covalentemente ligados a proteínas, formando os PGs, que podem conter ainda oligossacarídeos N-e/ ou O- ligados (Nilsson, Luca, 1982). Os GAGs sulfatados se ligam ao eixo proteico, com exceção do queratam sulfato, por meio de um tetrassacarídeo ácido glucurônico-galactosil-galactosil-xilose (GluUA-Gal-Gal-Xil) (Figura 5), onde a extremidade redutora se une a proteína por uma ligação do tipo O-glicosídica entre a xilose do tetrassacarídeo e a hidroxila de um resíduo de serina, enquanto a extremidade não redutora se liga a cadeia de GAG (Iozzo 1998).

Devido a grande heterogeneidade, a classificação dos PGs é complexa. A presença de uma ou várias moléculas de GAGs ligadas a uma cadeia polipeptídica é a única característica comum entre eles (Iozzo 1999). Portanto, a forma mais comum de classificação se baseia na localização dos PGs e na estrutura do eixo proteico. Os PGs se localizam: *i*) na matriz extracelular (seja na matriz intersticial ou na membrana basal); *ii*) na superfície celular; *iii*) em grânulos citoplasmáticos. Os PGs de matriz intersticial estão constituídos pelos: *i*) pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs); *ii*) proteoglicanos de alto peso molecular ou Hialectanos e *iii*) proteoglicanos facultativos (**Anexo B**).

Figura 4 - Esquema da região de ligação dos glicosaminoglicanos ao esqueleto proteico.

Xil: xilose; Gal: galactose; AU: ácido urônico; Hex: hexosamina; NGal: N-acetilgalactosamina; NGlc: N-acetilglucosamina; AS: ácido siálico; Man: manose; Ser: serina; Asp: asparagina; Thr: treonina; Fuc: fucose

Fonte: Adaptado Iozzo, 2002

1.2.2.1 Pequenos proteoglicanos ricos em leucina

Os pequenos proteoglicanos ricos em leucina atualmente compõem uma família de moléculas que compreende pelo menos 18 membros, que embora relacionados, evoluíram a partir de genes diferentes, adquiriram funções próprias e alcançaram um elevado grau de sofisticação. Inicialmente eles foram agrupados com base em seu pequeno eixo proteico (36-46 kDa) e em sua organização estrutural composta de repetições ricas em leucina (LRRs). Essa família de moléculas foi expandida abrangendo um total de 18 genes. Entretanto, alguns dos produtos destes genes não são verdadeiros proteoglicanos como classicamente definidos (Schaefer, Iozzo 2008; Schaefer L, Schaefer R, 2010).

Identificam-se cinco classes de SLRPs com base na conservação da proteína durante a evolução, presença de diferentes sequências ricas em cisteína na região N-terminal, número de repetições ricas em leucina e organização genômica. Outra característica típica dos SLRPs descrita é a repetição 'ear' (McEwan et al., 2006). Contudo, toda a classe tem como característica geral um domínio central, contendo repetições ricas em leucina, flanqueado nos dois lados por pequenas sequências ricas em cisteína. O protótipo do grupo, o decorim (DCN), e alguns dos SLRPs são apresentados de forma esquemática na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática de alguns SLRPs.

Fonte: Adaptação: Mochizuki Y, Shinomura T, Kimata K (1998).

A classe I dos SLRP inclui o decorim (DCN), o biglicam (BGN) e o asporim. O N-terminal tem os típicos resíduos de Cys em tandem que formam duas pontes dissulfeto, embora DCN e BGN possam ser substituídos com uma ou duas cadeias de condrotim/dermatam sulfato. O asporim perdeu o típico dipeptídeo SER-GLY e o flanco de aminoácidos requerido para glicação, por esta razão o asporim é considerado um proteoglicano não clássico. DCN e BGN mostram o maior grau de homologia (57% de identidade) entre os membros da classe e apresentam a sequência de consenso rica em cisteína com a estrutura CX_3CXCX_6C , diferentemente de todos os demais. A classe II inclui o fibromodulim, lumicam, queratocam, PRELP e osteoaderin, subdivididos ainda em três subclasses. Todos apresentam a sequência de consenso CX_3CXCX_9C no domínio rico em cisteínas da extremidade N-terminal e contêm cadeias de queratam sulfato. A classe III inclui epificam, mimecam (osteoglicim) e opticism, que apresenta sequência rica em cisteína do tipo CX_2CXCX_6C . Epificam é um PG de condrotim ou dermatam sulfato, mas pode ser secretado como glicoproteína na ausência dos PGs (Iozzo, 1999; Iozzo, 1998; Schaefer, Iozzo, 2008; Iozzo, Schaefer, 2010). A classe IV, que possui sequência de consenso do tipo $CX_3CXCX_{6-17}C$, abrange um grupo de proteoglicanos não canônicos, que inclui condroaderim, cictalopim e tsukushi (Schaefer e Iozzo, 2008). A classe V, outra classe de SLRPs não canônica, contém dois genes podocam e a proteína 1 semelhante a podocam, apresentando sequência de consenso do tipo $CX_{3-4}CXCX_9C$ (Schaefer, Iozzo, 2008).

Acreditava-se que os SLRPs agiam exclusivamente como componentes estruturais. Atualmente, essa família de moléculas é reconhecida como participante-chave na sinalização celular, sendo capaz de influenciar uma variedade de funções celulares como, proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão, migração e respostas inflamatórias. Todas essas funções são mediadas pela capacidade intrínseca dos SLRPs de interagirem com citosinas e ligarem-se à receptores de superfície celular (Schaefer, Iozzo, 2008).

O DCN contém uma cadeia de condrotim sulfato ou dermatam sulfato ligado ao seu eixo proteico. O eixo proteico apresenta estrutura globular e peso molecular de aproximadamente 40 kDa. O DCN distribui-se regularmente ao longo da fibrila de colágeno “decorando-a” e, por essa razão, recebeu esse epônimo (Ruoslahti, Yamaguchi, 1991; Scott 1988). O decorim regula a fibrilogênese *in vitro* e *in vivo* (Danielson et al., 1997). Decorim também regula a bioatividade de fatores de

crescimento (Coppock, 1993; Ruoslahti et al., 1990; Yamaguchi, 1988) pode suprimir o crescimento de células tumorais interagindo com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Moscatello, 1998) levando ao sua inibição. Outro efeito do DCN é a ativação da caspase 3, uma enzima chave envolvida na morte celular programada, incrementado sua atividade antioncogênica (Seidler et al., 2006). Por outro lado, em células normais, o DCN sinaliza através do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-IR do inglês insulin-like growth factor receptor I) exercendo um efeito anti-apoptótico e antiproliferativo (Schönherr et al., 2005). No trofoblasto extraviloso, o DCN inibe a migração afetando a via de sinalização do IGF-IR (Iacob et al., 2008).

O BGN apresenta cadeias de dermatam sulfato ou condroitim sulfato ligada a seu eixo proteico. O peso molecular de seu eixo proteico cerca de 40 kDa. Recebeu esse nome por frequentemente conter duas cadeias de glicosaminoglicanos, embora possa aparecer com apenas uma cadeia. BGN serve como antagonista de diferentes receptores de superfície celular, dando origem a diversos resultados biológicos (Iozzo, Schaefer, 2010). O BGN atua como uma molécula sinalizadora, de especial importância no sistema imune inato. Este proteoglicano, em sua forma solúvel se transforma em um ligante endógeno de receptores da imunidade inata e interage com os receptores Toll-Like (TLR) - 2 e 4 dos macrófagos, desencadeando uma robusta resposta inflamatória (Babelova et al., 2009; Schaefer et al., 2005).

1.2. 2.2 Proteoglicanos de alto peso molecular - Hialectanos

Os proteoglicanos de alto peso molecular também chamados hialectanos (*Hyaluronic and lectin-binding proteglycan*) ou LEC-HABP (*Lectin-hyaluronic acid binding protein*) estes últimos nomes estão relacionados com seus domínios. Os hielactanos compõem uma família de moléculas que apresentam como característica comum uma estrutura de tridomínio: um domínio N-terminal que permite interação com hialuronato (HA), um domínio central que contem as cadeias de GAGs, e um domínio C-terminal ao qual se ligam lectinas. A esta família pertencem quatro genes diferentes: denominados: agrecam, versicam, neurocam e brevicam

O versicam caracteriza-se pela capacidade de interagir com o HA. Este proteoglicano possui um menor número de cadeias de condroitim sulfato ligadas ao seu esqueleto proteico que o agrecam. O eixo proteico de versicam apresenta peso

molecular de cerca de 260 kDa. Contem três domínios globulares, G1, G2 e G3. O domínio G1 tem uma repetição de Ig seguida por dois módulos consecutivos, os módulos de ligação da proteína, os quais estão envolvidos na mediação da ligação da proteína ao HA. O domínio G2 é formado por dois grandes subdomínios, designados como GAG- α e GAG- β . Existem quatro isoformas de versicam formadas pelo *Splicing* alterantivo do RNAm, denominadas de V0, V1, V2 e V3 (Zimmernann, 2000). A maior isoforma V0 contem ambos subdomínios GAG- α e GAG- β , a V1 contem só GAG- β , a V2 contem só GAG- α e a isoforma V3 não possui nenhum destes subdomínios. O domínio G3 contém uma série de motivos estruturais incluindo duas repetições EGF-like, um domínio de lectina do tipo C, e um módulo de proteína semelhante a reguladores do complemento (Iozzo, 1998) (Figura 6). O versicam interage com diversas moléculas da MEC, como colágeno I e fibronectina, além de ser reconhecido por receptores como o CD-44 e a integrina $\beta 1$, participando de processos como proliferação e diferenciação celular (Wight, 2002; Yao et al., 2005).

Figura 6 - Representação esquemática de versicam um proteoglicanos de alto peso molecular.

Fonte: Adaptado Edwards (2012).

A versatilidade dos PGs e sua capacidade de interagir com um amplo repertório de moléculas lhes permitem atuar como mediadores de interações celulares, podendo unir-se tanto a outros componentes da MEC, como participar na interação célula-matriz extracelular ou interagir com moléculas solúveis no meio extracelular imobilizando-as nesse compartimento (Schaefer L, Schaefer R, 2010).

1.2.3 Matriz extracelular do Útero

Durante o desenvolvimento da decídua, os fibroblastos endometriais tornam-se volumosos e os espaços intercelulares entre eles diminuem. Nos últimos anos, o Laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular (LBR-MEC) tem se dedicado a compreender o impacto da decidualização na organização e composição da MEC, e a importância dessas moléculas na decidualização, implantação e desenvolvimento embrionário. Esses estudos pioneiros mostraram que a MEC endometrial sofre uma extensa remodelação durante o ciclo reprodutivo e a gestação. Durante a gestação, os primeiros indícios de remodelação da MEC do endométrio são observados no segundo dia de gestação, pela presença de estruturas fosfatase ácida-positivas contendo fibrilas de colágeno no interior dos fibroblastos, o que sugere a sua fagocitose e degradação intracelular (Bijovsky et al., 1992). Corroborando este resultado, análises realizadas pela histoquímica do picrosírio (Martello, Abrahamsohn, 1986) e microscopia eletrônica de transmissão (Zorn et al., 1986) mostram a escassez de fibrilas de colágeno no 4º dg. Também foi demonstrado que as células deciduais depositam uma MEC com características próprias o que sugere um papel importante destas moléculas para o estabelecimento da gestação (Abrahamsohn, Zorn, 1993; Abrahamsohn et al., 2002; Favaro et al., no prelo).

Em humanos (Aplin, 2002) e camundongos (Abrahamsohn et al., 2002) a decidualização envolve a remodelação da MEC. Em camundongos esta modificação são notáveis, pois a decidualização promove um espessamento das fibrilas de colágeno, (Zorn et al., 1986; Alberto-Rincon et al., 1989), mudanças no perfil de expressão e distribuição dos colágenos nos compartimentos da decídua (Spiess et al., 2007; Teodoro et al., 2003;) e mudanças na distribuição dos proteoglicanos (San Martin et al., 2003a,b; San Martin, Zorn, 2003; San Martin et al., 2004).

Foi observado que a partir do 5º dg ocorre um aumento na deposição de colágeno ao redor das células deciduais (Martello, Abrahamsohn, 1986; Zorn et

al., 1986) observações confirmadas por estudos bioquímicos conduzidos por Teodoro et al., 2003. Por meio de um estudo radioautográfico ultraestrutural após a injeção de 3-H prolina demonstrou-se que as células decíduais sintetizam colágeno, (Oliveira, 1991). Os colágenos tipo I e III são os principais componentes do endométrio de animais não grávidos, no entanto no endométrio de animais grávidos além deste colágenos, o colágeno tipo V passa a ser expresso pelas células decíduais (Spiess et al., 2007). Estudos realizados por San Martin e colaboradores (2003) demonstraram que proteoglicanos como o decorim (DCN), biglicam (BGN), lumican (LUM) pertencentes à família dos SLRPs são profundamente modulados durante o processo de decidualização do endométrio em camundongos. Enquanto o DCN presente no endométrio não decidualizado é abolido da região da decídua madura, o BGN e LUM são depositados pelas células decíduais. Demonstrou-se por um estudo imunohistoquímico ultraestrutural, que o DCN se associa às fibrilas finas, enquanto que o BGN se associa exclusivamente às fibrilas espessas de colágeno, indicando a participação destes proteoglicanos na modulação da fibrilogênese do colágeno no endométrio (San Martin, Zorn, 2003). Confirmando estes resultados, animais deficientes para o gene de decorim apresentam alterações na fibrilogênese no diâmetro das fibrilas de colágeno do endométrio (Sanchez et al., 2010). Outros proteoglicanos membros de outras famílias como o versicam (San Martin et al., 2003b), perlecan e sindecam-4 (San Martin et al., 2004) são expressos pela decídua. Abundante depósito de versicam foi imunolocalizado na região de células decíduais maduras e na região de células pré-decíduais enquanto apenas traços desse proteoglicanos foi imunodetectado na região do estroma não decidualizado (San Martin et al., 2003b).

Por outro lado, observou-se que fêmeas nocaute para o receptor da interleucina-11, são inférteis e apresentam severo comprometimento da decidualização (Robb et al., 1998). Adicionalmente, observou-se que nestes animais ocorrem alterações na composição da MEC da decídua, em decorrência de alterações na expressão de genes para o colágeno tipo III, BGN, nidogênio e osteonectina (White et al., 2004). Esses resultados dão suporte aos estudos do nosso laboratório e confirmam a importância da MEC para o processo de decidualização e consequente implantação e desenvolvimento do embrião.

1.3 Os Hormônios Esteróides Ovarianos e Seus Receptores

Os receptores de hormônios esteroides são essenciais na fisiologia humana e de roedores, conforme exemplificado pelas consequências dramáticas da perda do receptor, observadas em animais nocautes. Os hormônios esteroides estão integrados em cada aspecto da fisiologia reprodutiva dos mamíferos, em ambos sexos, incluindo o desenvolvimento, gametogênese, função gonadal do controle Hipotálamo - pituitária, comportamento sexual e maternal, gestação e lactação.

O E2 e a P4 são hormônios esteroides produzidos pelos ovários. Ambos são moléculas lipossolúveis que atuam por meio de seus receptores nucleares, por serem moléculas sinalizadoras hidrofóbicas passam através da membrana plasmática das células-alvos. Contudo, em vez de ativar as enzimas intracelulares, eles se ligam a proteínas receptoras localizadas no citosol ou no núcleo. Esses receptores hormonais atuam como fatores de transcrição sendo capazes de regular a expressão gênica, mas se encontram na forma inativa nas células não estimuladas. Quando ocorre a ligação do hormônio, o receptor passa por uma grande mudança conformacional que o ativa, formando complexos e tornando-o capaz de promover ou inibir a transcrição de um grupo específico de genes. Cada hormônio se liga a um receptor próprio que, por sua vez, estimula a expressão de genes exclusivos assim como genes compartilhados. Esses complexos receptores de esteroides podem, também, afetar a estabilidade de RNAs mensageiros específicos. Os esteroides são efetivos durante horas ou dias e, muitas vezes, influenciam o crescimento e a diferenciação de tecidos específicos (Revisado em: Couse et al., 2006; Heldring et al., 2007; Matthews, Gustafsson, 2003).

1.3.1 Estrutura dos Domínios dos receptores nucleares

Existe uma notável conservação tanto na sequência de aminoácidos como nas diferentes regiões que funcionais dos diversos receptores nucleares (RN). Comum a todos os membros da família dos RN é a estrutura modular de domínios, cada um dos quais alberga uma função autônoma que é crítica para a ação global do receptor. Os receptores esteroides são compostos por cinco módulos funcionais: (i-ii) domínio A/B ou NTD, (iii) domínio C ou domínio de ligação a DNA, (iv) domínio E ou região de charneira, e (v) domínio D ou LBD (Figura 7).

Figura 7 - Esquema da organização estrutural dos receptores nucleares esteroides

Os domínios mais conservados C e E estão representados como caixas abertas e os domínios menos conservados A/B, D e F como barras grossas. O domínio F é único dos receptores de estrógeno (ER). A função dos domínios modulares, AF-1 e AF-2 são conhecidos e indicados como os dois domínios da função de ativação da transcrição. O domínio AF-1 está ancorado na região A/B e exibe uma atividade constitutiva *in vitro*, ao passo que o domínio AF-2 está situado com o domínio ligante de ligação (E) e é essencial para a ativação do receptor induzido pelo ligando.

Fonte: Adaptado do Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3er ed. 2006.

(i) Domínio A/B ou DNT (domínio N-Terminal): Todos os receptores nucleares possuem uma região DNT de comprimento variável (100-500 aminoácidos). Este é o domínio com maior variação no comprimento e possui pouca homologia entre os RN, embora algumas características estruturais sejam conservadas. A região DNT de cada um dos receptores de esteroides sexuais abriga a função de ativação transcricional-1 (AF-1) e fornece para a célula e a atividade específica do promotor do receptor (Couse et al., 2006).

(ii) Domínio C ou de Ligação ao DNA: Este domínio mapeia-se nas proximidades do centro da sequência primária, exibindo o arranjo em “dedo de Zinco”. Esta é a região mais conservada (55-80%) entre os membros da família RN. A funcionalidade deste domínio está dada por um motivo de dois dedos de zinco, os quais facilitam a ligação do complexo hormônio-receptor ao DNA. Este domínio é a região dos receptores nucleares que especificamente tem a função de reconhecer e ligar às sequências cis-atuantes que potenciam, ou HREs (elementos responsivos a hormônio), que estão localizadas dentro de regiões reguladoras de genes alvo.

Elementos de resposta ao receptor nuclear são sequências de nucleotídeos características dos sítios de DNA, chamados *elementos resposta*, que ligam vários receptores. As sequências dos elementos resposta consenso para os receptores de estrógeno são repetições invertidas com 6 pares de bases separadas por quaisquer três pares de base (Curtis et al., 2002; Heldring et al., 2007).

(iii) Domínio D ou Região da dobradiça: este domínio serve para conectar os domínios mais conservados (C e E). Comumente referido como a região "dobradiça", se postula que serve para amortecer qualquer impedimento estérico que ocorrem entre o domínio C e E, permitindo, assim, que as regiões de ligação de DNA e a de fixação do ligando possam se organizar em uma infinidade de combinações que podem afetar diferencialmente a ação do receptor (Couse et al., 2006).

(iv) LBD o domínio E: é uma região multifuncional altamente estruturada que serve principalmente para ligar especificamente o ligante e permitir a atividade transcricional dependente do ligante. Este domínio de ligação de hormônio situa-se próximo à extremidade C-terminal desses receptores e contém um domínio de ativação dependente do hormônio. Em alguns casos, na ausência do ligante, o domínio de ligação funciona como domínio de repressão. Um domínio AF-2 localiza-se na região C-terminal deste domínio. O AF-2 é um forte ativador de transcrição no RE e RP. No domínio E existe também uma interface para dimerização dos receptores, e sítios para a interação do receptor com proteínas de choque térmico (Pratt, Toft, 1997; Couse et al., 2006).

(v) Domínio F: Só os ERs possuem um domínio F bem definido. Embora alguns dados indiquem que o domínio F possa ter um papel no recrutamento de co-ativadores e na estabilidade receptor, sua estrutura ainda é pouco conhecida bem como suas funções.

1.3.2 Mecanismos de ação dos receptores

A bioquímica geral dos receptores e sua ativação dependente de ligante, é referida como “o modelo clássico” de função dos receptores (Figura 8). Vários mecanismos alternativos de sinalização do receptor, os quais diferem do modelo clássico, têm sido propostos, incluindo: (i) *cross-talk* com sistemas intracelulares e segundos mensageiros que permitem a ativação do receptor na ausência do ligante (Figura 9). (ii) *Tethering* mecanismo pelo qual o receptor interage com fatores de transcrição heterólogos, permitindo a regulação de genes que carecem de sequências HRE em seu promotor (Figura 10); (iii) sinalização por receptores associados à membrana plasmática, com frequência chamada “ação não genômica dos esteroides”, pela qual são ativadas vias de sinalização intracelulares em um curto espaço de tempo, diferentemente da ação genômica que demanda um tempo maior.

Figura 8 - Esquema do modelo clássico de ação dos receptores esteroides

S: esteroide; HRE, elementos responsivos ao hormônio; HSPs: proteínas de choque térmico; TBP, TATA: proteínas de ligação; TAFs, TBP: Fatores associados; poli II: RNA polimerase.

Fonte: Adaptado do Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3er ed. 2006

Figura 9 - Esquema do mecanismo de ação dos esteroides ligando independente o “cross-talk”.

A estimulação hormonal do receptor ativa a cascata de sinalização das quinases e poderia ativar os receptores hormonais via fosforilação em ausência do ligando esteroides. H, hormônio trófico; AC, Adenil ciclase; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteína quinase A; P, fosforilação; HRE, elementos responsivos ao hormônios; SR, receptor esteroide; CoA, coativador; TBP, TATA proteínas de ligação; TAFs, fatores associados a TBP; poli II, RNA polimerase II.

Fonte: Adaptado do Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3er ed. 2006

Figura 10 - Esquema da regulação dos receptores esteroides que perdem a via HERs “Thethering”.

O esquema mostra um mecanismo putativo pelo qual os receptores esteroides sexuais ativam os ligantes e, desse modo, modulam a expressão de genes que não possuem um HRE dentro de suas regiões promotoras. Receptores ativados por ligante que se acredita interagem com outros fatores de transcrição, exemplo: FOS/JUN, que se une a seu respectivo elemento de resposta a ADN (AP-1). Este complexo é, então, capaz de recrutar proteínas co-reguladoras e induzir a expressão de genes em resposta aos respectivos esteroides sexuais. S, esteroide; HRE, elementos responsivos aos hormônios; HSPs, proteínas de choque térmico; TBP, TATA proteínas de ligação; TAFs, fatores associados a TBP; poli II, RNA polimerase II.

Fonte: Adaptado do Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3er ed. 2006

1.3.3 Receptores de estrógeno no útero de camundongos fêmeas

Muitos dos avanços na compreensão das funções dos receptores esteroides no trato reprodutivo feminino foram realizados em modelos murinos “*Knockout*”.

Os ER são produtos de dois genes diferentes, denominados ESR1 e ESR2, formando o ER- α (66 kDa) e o ER- β (60-63 kDa). Estes receptores apresentam alta homologia no domínio de ligação ao DNA (98%) e baixa homologia no domínio de interação com o ligante (54%). A região promotora do gene ESR1 tem sido

amplamente caracterizada, revelando a presença de múltiplas regiões reguladoras e promotoras. Foram descritos elementos reguladores controlados por AP-1, SP1 e pelo próprio ER. (Couse et al., 2006; Heldring et al., 2007). Em camundongos adultos, tanto transcritos do ER- α quanto a imunoreatividade estão elevadas no epitélio uterino antes da ovulação embora diminuam durante o início da gestação, ao passo que a expressão no estroma se mantém (Couse et al., 2006; Tan et al., 1999). Em contraste, a expressão do ER- β é relativamente baixa tanto no útero de animais virgens como durante a gestação (Couse et al., 1997; Jefferson, 2000). Em camundongos ovariectomizados, ER- α e ER- β foram detectados no epitélio, no estroma e no miométrio (Couse et al., 2006), o que indica que os hormônios ovarianos alteram o padrão de expressão. Há fortes evidências funcionais demonstrando que o ER- α é o principal responsável por mediar os efeitos do estrógeno no útero.

Camundongos fêmeas nocaute para ER- α exibem uma arquitetura normal do útero, pois apresentam bem definido os três compartimentos uterinos (miométrio, estroma endometrial e epitélio), porém o útero é hipoplásico, com a metade do peso dos úteros dos camundongos selvagem (Couse, Korach, 1999). O útero adulto não é responsivo à estimulação pelo estrógeno quer endógeno quer exógeno (Couse et al., 2006). Embora respondam com a decidualização quando estimulado por tratamento hormonal exógeno, não permitem a implantação do embrião. Em contraste, camundongos fêmeas nocautes para ER- β apresentam desenvolvimento e função normais.

A mucosa vaginal é composta de epitélio e estroma, a qual possui níveis expressivos de ER e é muito suscetível ao estrógeno. Os estrógenos (endógenos ou exógenos) induzem a diferenciação do estroma, proliferação epitelial e a síntese de queratina pelo epitélio gerando a camada de células cornificadas superficial. Estas mudanças na histologia da mucosa são utilizados para estimar o nível de esteroides gonadais circulantes e determinar a fase do ciclo reprodutivo ou estral. Em camundongos fêmeas nocaute para o ER- α , ainda que expostas a elevadas doses de estrógeno, não é possível observar resposta do epitélio vaginal. Em contraste o epitélio vaginal de camundongos fêmeas nocaute para ER- β exibem as alterações cíclicas normais. Portanto, a estrogenização da mucosa vaginal em roedores, a qual é crítica para o acasalamento, é dependente de ER- α (Couse et al, 2006). Outros estudos mostraram que o bloqueio da aromatase P450, uma enzima chave na

conversão dos andrógenos em estrógenos, causa inibição do processo de decidualização, sugerindo que uma síntese *de novo* de E2 no útero é essencial para a decidualização (Das et al., 2009). O antígeno 1 relacionado com Fos (FRA-1), um alvo do estrógeno e membro da família de fatores de transcrição Fos, mostrou-se ser um mediador crítico da decidualização (Das et al., 2012).

1.3.4 Os Receptores de progesterona no útero de fêmeas de camundongos

Os PR são gerados por dois promotores diferentes localizados no gene PGR, o que permite a formação de duas isoformas do receptor de progesterona (PR), PR-A (94 kDa) e PR-B(114 kDa). Os dois PR são idênticos em todas as regiões, exceto em NTD, a qual está truncada em algumas espécies. Uma terceira isoforma, chamada PR-C, foi descoberta em humanos (Couse et al., 2006). Em muitos tecidos, especialmente no trato reprodutivo feminino, a expressão dos RP é induzida diretamente pelo estradiol (Kraus, Katzenellenbogen, 1993).

No útero de camundongos, tanto os níveis de transcritos como os níveis protéicos dos PR, são baixos no dia um e dois da gestação e a maior expressão acontece no epitélio e no estroma subepitelial (Tibbetts et al., 1998). Os níveis PR aumentam nos mesmos tecidos nos dias três e quatro de gestação, período que antecede a implantação. As ações mediadas pelos ER são fundamentais para a expressão dos PR no útero de camundongos, sendo estas ações específicas e diferentes para cada compartimento uterino. A ovariectomia leva a um incremento dos níveis do PR no epitélio uterino que pode ser reduzido mediante tratamento com estradiol exógeno, o que indica que o estradiol atua como um repressor da expressão do PR nesse compartimento uterino (Kurita et al., 2001).

Camundongos *nocaut* para ambos os PR apresentam um útero normalmente desenvolvido. Entretanto, não apresentam a resposta decidual normal impedindo, portanto, a implantação do embrião (Conneely et al., 2002). O epitélio uterino também apresenta hiperplasia em resposta ao E2. Os camundongos *nocaut* para PR-A exibem uma morfologia semelhante ao observado às fêmeas *nocaut* para ambos receptores (Conneely et al., 2002). Contrariamente, em fêmeas *nocaut* para PR-B a morfologia uterina é normal. A reação decidual também ocorre normalmente, permitindo a implantação do embrião. Em adição, o útero não apresenta hiperplasia do epitélio em resposta aos estrógenos (Couse et al., 2006). Durante a fase

secretora do ciclo estral de murinos, a diminuição dos níveis circulantes de estrógeno, paralelamente com o incremento de progesterona, gera uma mudança na proliferação uterina que deixa de ocorrer no epitélio e passa a ocorrer nas células do estroma (Tong, Pollard, 1999). Dessa forma acredita-se, que a ação da progesterona mediada pelos seus receptores, modula negativamente a proliferação do epitélio uterino induzida pelo estradiol (Tong, Pollard, 1999).

A ação da P4 mediada por seus receptores é crítica para a preparação do endométrio para a gestação. A implantação embrionária é um processo altamente complexo que requer a cooperação sincronizada entre o blastocisto e o epitélio uterino. O pico de E2 circulante durante a ovulação desencadeia uma cascata de proliferação no epitélio glandular e luminal no útero, e a expressão de PR no estroma endometrial e no miométrio. O aumento pós-ovulatória da P4 gera a decidualização, processo complexo que envolve a intensa proliferação e diferenciação do estroma endometrial e aumento localizado da permeabilidade vascular. Por outro lado, a progesterona exerce uma função importante ao suprimir a resposta inflamatória uterina que acompanha a implantação do embrião. A sinalização da P4 ovariana através de seus receptores é essencial para o desenvolvimento uterino pós-implantação e decidualização (Connely et al., 2002). Em experimentos onde se induziu a decidualização em fêmeas ovariectomizadas observou-se que só a P4 é capaz de manter a resposta decidual (Paria et al., 1999).

1.4 Cultivos de células deciduais antimesometriais

Estudos prévios realizados em nosso e em outros laboratórios, mostraram que culturas primárias de células deciduais mantêm as características essenciais que estas células possuem *in vivo*, tais como: binucleação e poliploidia (Amaral, 1998; Bell, Searle, 1981), Mantém ainda o conjunto de organelas como lisossomos (Sananes et al., 1978), e aquelas envolvidas com a síntese e secreção de macromoléculas (Bell, Searle, 198; Fontanele, 1999; Sananes et al., 1978). A manutenção das características biológicas vistas *in vivo* é comprovada pela expressão de filamentos intermediários de desmina, um marcador de células deciduais além de vimentina em seu citoplasma (Amaral, 1998; Fontanele, 1999;

Glasser, Julian, 1986; Sananes, 1978). Além disso, estabelecem junções do tipo comunicantes e aderentes (Domingues, 1999). O primeiro trabalho com cultura de células decíduais foi desenvolvido por Kisalus em 1987, no qual foi mostrado que culturas de explantes de decídua humana são capazes de sintetizar e secretar diversas moléculas da MEC como os colágenos do tipo I, III, IV, V e as glicoproteínas, laminina (LAM) e fibronectina (FNC). Trabalhos recentes com células decíduais humanas, de ratas e camundongos fêmeas, confirmaram os resultados de Kisalus, mostrando que as células decíduais em cultivo produzem proteoglicanos, inibidores de proteases e expressam integrinas (Alfonso et al., 1997; Babiarz et al., 1996; Costa, 2002; Damsky et al., 1994; Sutherland et al., 1993)

De posse de um conjunto de resultados obtidos do nosso laboratório e de outros do papel dos hormônios ovarianos no controle da decidualização, implantação e remodelação da matriz extracelular endometrial, o presente estudo foi delineado com o objetivo de conhecer se o embrião teria, eventualmente, algum papel modulador na remodelação da MEC durante o processo de decidualização do endométrio. Tem ainda como objetivo ampliar a compreensão sobre a ação dos os hormônios E2 e MPA sobre o comportamento das células decíduais na produção de componentes da MEC.

Resultados de outros e do nosso laboratório mostraram que a formação da decídua altera a distribuição de colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas no endométrio (Muro, 2000; San Martín et al., 2003a,b; Spiess et al., 2007). Recentemente, estudos do nosso laboratório (Salgado et al., 2009) demonstraram que PGs da família dos SLRPs são profundamente modulados nos tecidos uterinos durante o ciclo estral sugerindo uma ação dos hormônios ovarianos nessa modulação. Embora existam informações indicando, fortemente similaridades entre a decídua e o deciduoma, a composição e remodelação da MEC, do deciduoma é ainda completamente desconhecida. Além disso, embora, como amplamente informado nessa introdução existam dados consistentes sobre a influência dos hormônios ovarianos na modulação da expressão de moléculas da MEC na decídua, não se pode descartar a possibilidade de sinais oriundos do embrião possam participar desse processo.

2 OBJETIVOS

Considerando-se que a decidualização do endométrio na gestação normal leva à extensa modificação do estroma endometrial, o que afeta, de modo evidente, a composição da MEC e, que os hormônios ovarianos têm um papel fundamental no desenvolvimento da decídua e do deciduoma, o objetivo do presente estudo foi:

2.1 Objetivos Gerais

- i) Caracterizar a matriz extracelular do deciduoma durante seu desenvolvimento comparando-a com os dados existentes para a decídua;
- ii) Analisar o perfil hormonal das fêmeas pseudográvidas e grávidas durante o processo de decidualização;
- iii) Avaliar o comportamento das células deciduais obtidas do endométrio de camundongos fêmeas pseudográvidas em cultura quanto a síntese e secreção de moléculas da MEC, sob a influência dos hormônios ovarianos estrógeno e medroxiprogesterona.

2.2 Objetivos Específicos

- i) Identificar e localizar, por imuno-histoquímica, a presença e a distribuição têmporo-espacial dos colágenos tipo I, III, IV e V e dos proteoglicanos decorim, biglicam e versicam, durante o desenvolvimento do deciduoma, entre o 5º e 8º dia de pseudogestação;
- ii) Caracterizar o perfil hormonal por meio do padrão do esfregaço vaginal das fêmeas do dia 5º ao 8º de gestação e pseudogestação.
- iii) Analisar a morfologia do ovário durante o desenvolvimento da decídua e deciduoma do 5º ao 8º de gestação e pseudogestação;
- (iv) Estabelecer culturas primárias de células deciduais de camundongos, obtidas do deciduoma e cultivadas em meios suplementados com hormônios ovarianos E2 e MPA (medroxiprogesterona; análogo da progesterona);

- (v) Analisar a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona nas células cultivadas por meio de método imunocitoquímico;
- (vi) Determinar *in vitro* o efeito dos hormônios E2 e MPA, sobre células decidualizadas tratadas por 24, 48 e 72h, em relação aos seguintes parâmetros: níveis de RNAm; níveis protéicos e localização dos proteoglicanos decorim e biglicam, pelos métodos de qPCR, Western blot e imunocitoquímica.

3 MATERIAIS & MÉTODOS

Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Número da autorização: 075/130/02).

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos (2 a 12 meses) e fêmeas (3 a 5 meses). Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP. Os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a 22 °C, com água e alimento *ad libitum*. Os animais receberam ração Nuvilab CR1® (Nuvital, São Paulo, Brasil).

3.2 Esfregaço Vaginal

Esfregaços vaginais foram obtidos de camundongos fêmeas grávidas e pseudográvidas com o objetivo de comparar o perfil hormonal desses dois grupos de animais. Os esfregaços foram realizados durante o período da manhã do segundo ao oitavo dia de gestação, (o primeiro dia é correspondente àquele em que foi encontrado o tampão vaginal, o que indica que houve cópula entre macho e fêmea).

A coleta do material foi obtida com o auxílio de uma escova embebida em solução salina introduzida na vagina do animal. Essa escova foi deslizada gentilmente sobre a superfície limpa de uma lâmina histológica de vidro, que, posteriormente, foi imersa em uma solução fixadora de etanol 70% - éter 1:1 por 10 minutos. As lâminas com o estendido citológico fixado foram, então, imersas em etanol 70% (dois minutos), H₂O (dois minutos), Hematoxilina de Harris (sete minutos), H₂O (10 minutos), H₂O (dois minutos), etanol 70% (dois minutos), etanol 80% (dois minutos), corante de Shorr (10 minutos - sob agitação), etanol 95%. Finalmente, as lâminas foram desidratadas em etanol absoluto, diafanizadas em xilol e montadas em goma de Damar para posterior análise.

3.3 Procedimentos para a Vasectomia

Machos com dois meses de idade foram esterilizados por meio de vasectomia bilateral, segundo o protocolo padronizado no LBR-MEC por Andrade (1993).

Para os experimentos, os animais foram anestesiados com Avertin (2,5 g de 2,2,2-tribromoethanol em 5 ml de 2-methyl-2-butanol em 200 ml de água ddH₂O). Esta solução foi administrada intraperitonealmente, na dose de 0,1 ml por grama de peso corporal. O acesso aos ductos deferentes foi obtido por meio de uma incisão abdominal, de aproximadamente um centímetro de comprimento, acima da sínfise pubiana. Cada ducto teve um curto segmento isolado por fios cirúrgicos amarrados em suas duas extremidades e, em seguida, seccionados. A incisão foi suturada e o local antisséptico. Os machos foram acasalados após trinta dias da cirurgia com o objetivo de garantir o sucesso da vasectomia.

3.4 Indução da pseudogravidez

A indução da pseudogravidez foi realizada pelo acasalamento de camundongos fêmeas com machos vasectomizados. Os animais foram acasalados durante o período noturno (17 h até 9 h), na proporção de duas fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte, as fêmeas foram examinadas para a verificação do coito. Aquelas que apresentaram tampão vaginal foram selecionadas para os experimentos, sendo esse dia considerado o primeiro dia de pseudogestação (psg).

3.4.1 Indução da decidualização

A decidualização foi induzida artificialmente utilizando um protocolo amplamente empregado na literatura e previamente padronizado em nosso laboratório, o qual consiste numa injeção de 50 µL de óleo de amêndoas doce, em cada um dos cornos uterinos, expostos por laparotomia dorsal, realizada no quarto dia de psg.

3.5 Coleta de deciduomas e ovários

Os animais (mínimo de três por grupo) foram sacrificados por deslocamento cervical, nos dias 5, 6, 7 e 8 de psg. Os ovários e cornos uterinos foram extraídos e aqueles cujos cornos uterinos se apresentaram totalmente dilatados ou com aparência de colar de pérolas foram considerados deciduizados.

3.5.1 *Processamento para microscopia de Luz*

As amostras (úteros e ovários) foram liberadas de gordura, e imediatamente fixadas em Methacarn (metanol absoluto, clorofórmio e ácido acético glacial; 6:3:1) por 3 h a 4 °C. Em seguida foram lavadas em etanol absoluto, embebidas em Paraplast e submetidas à microtomia. Cortes de 5 µm foram aderidos a lâminas de vidro recobertas com 0,1% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Unidos) e secas a 37 °C.

3.5.2 *Processamento dos ovários*

Os ovários de camundongos fêmeas grávidas e pseudográvidas, do 5º ao 8º dia pós-coito foram coletados e processados rotineiramente para a análise histológica. Foram obtidos cortes seriados (5 µm cada um) de cada ovário, e montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina & Eosina e analisadas em um microscópio E600 Nikon Eclipse. As imagens foram capturadas usando câmera Olympus, DP72. De cada ovário foram contados os corpos lúteos presentes e obteve-se a média para cada dia analisado das amostras coletadas (n=5).

3.5.3 *Imunofluorescência*

Para determinar a distribuição dos colágenos na MEC do deciduoma foi utilizada a técnica de imunofluorescência, previamente padronizada por Spiess (2007) seguindo os seguintes passos: (1) recuperação antigênica por meio de tratamento enzimático das seções com 2 mg/ml de pepsina de porco em ácido acético 0,5 N por 10 min a 37 °C; (2) incubação por 1 h com soro normal de cabra,

diluído 1:1 (v/v) em PBS 10% BSA (w/v) a temperatura ambiente, a fim de que as ligações inespecíficas fossem bloqueadas; (3) incubação *overnight* com os seguintes anticorpos primários, desenvolvidos em coelho: anticolágeno tipo I, III, IV ou V, (103; 105; 106; 107 Rockland, Gilbertsville, PA) na concentração 1:50 em PBS contendo 0,3% de Tween 20 (v/v); (4) incubação por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC produzido em cabra (KPL, Gaithersburg, USA), na concentração 1:200 em solução de azul de Evans 6%; (5) lavagem montagem em meio aquoso contendo DAPI (KPL, Gaithersburg, USA). Cortes histológicos de pele de camundongos foram utilizados como controle positivo enquanto o controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário ou pela substituição deste por soro de coelho. As amostras foram examinadas em microscópio confocal Axiovert 100M Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), e as imagens capturadas com o *software* Axiovision (Zeiss).

3.5.4 Imunoperoxidase

Para determinar a distribuição dos proteoglicanos na MEC do decíduoma foi utilizada a técnica de imunoperoxidase, segundo o protocolo previamente padronizado por San Martin (2003a,b) como segue: (1) Após a desparafinização e hidratação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS); (2) bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (Merck) 3%; (3) recuperação antigênica com Condroitinase ABC 0,2 U/mL, em tampão tris-HCl 20 mM por 1 h a 37 °C; (4) bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos por incubação das amostras no soro do animal doador do anticorpo secundário (cabra) adicionado de PBS/BSA 10% por 1 h; (5) incubação das amostras *overnight* a 4 °C, em anticorpos primários contra biglicam (LF-106, NIH, USA), decorim (LF-113, NIH, USA) ou versicam (LS-C25140, Lifespan, Seattle, USA) nas concentrações de 1:1000, 1:3000, 1:50, respectivamente; (6) incubação em anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:200) (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) por 1 h; (7) revelação da reação por 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma) 0,03% em PBS e H₂O₂ 0,03%; (8) contra-coloração com hematoxilina; (9) desidratação, diafanização e montagem com resina e lâminula de vidro. A marcação específica foi testada por omissão do anticorpo primário ou por meio do uso de soro de coelho. As lâminas foram analisadas em um

microscópio E600 Nikon Eclipse as imagens foram capturadas usando-se câmera Olympus, DP72 e Image Pro Plus *software*.

3.6 Culturas de Células

3.6.1 Obtenção de células deciduais

As células deciduais foram isoladas dos cornos uterinos obtidos no sétimo dia de pseudogravidez por ser este o dia de maior desenvolvimento do decíduoma e, por já se encontrarem nesse período, os fibroblastos endometriais comprometidos com o fenótipo decidual. Na manhã do sétimo dia de psg, as fêmeas (três ou quatro por experimento) foram sacrificadas por deslocamento cervical e submetidas a uma laparotomia para a confirmação da decidualização. Os cornos uterinos que, por ocasião da coleta, apresentaram-se dilatados em toda a extensão ou mostraram dilatações significativas, morfológicamente semelhantes aos sítios de implantação da gestação normal, foram considerados decidualizados. Aqueles considerados decidualizados foram lavados em uma solução de PBS 1X gelada, e transferidos imediatamente para uma placa de Petri contendo PBS 1X gelado suplementado com antibióticos [(100 U/mL penicilina (Sigma), 100 µg/mL estreptomicina (Sigma), 2,5 µg/mL anfotericina, (Sigma)]. Em seguida, foram isolados e levados para uma capela de fluxo laminar, onde foi realizado o procedimento descrito a seguir: (i) lavagem com PBS 1X estéril suplementado com antibióticos e antifúngicos; (ii) isolamento do segmento antimesometrial, tomando-se como referência o posicionamento do mesométrio (iii) isolamento do miométrio (iv) dissociação mecânica dos fragmentos obtidos do estroma endometrial antimesometrial, em fragmentos de 1-2 mm.

3.6.1.2 Separação Enzimática

Os fragmentos dissociados foram transferidos para uma solução de PBS contendo 1,2 mg/ml de Colagenase tipo IA (Sigma) e 3,6 mg/ml de Dispase (Sigma) e mantidos nessa solução enzimática por 30 minutos a 37 °C em banho Maria. A cada 10 minutos, cada tubo que continha as amostras foi agitado manualmente, seguindo-se agitação por 10 segundos em um agitador do tipo Vortex. Decorridos os 30 minutos de digestão enzimática, foi adicionado 500 µl de uma solução de ácido

etileno diamino tetracético (EDTA) a 0,25% de concentração com a finalidade de cessar a ação enzimática. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente, para que ocorresse a sedimentação dos fragmentos não digeridos de tecidos, os quais foram descartados.

3.6.1.3 Isolamento das células decíduais maduras por centrifugação

Após o descarte dos fragmentos não digeridos de tecidos, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 4,5 ml de uma solução de 0,83% de cloreto de amônia (para promover a lise dos eritrócitos) e 0,5 ml de meio de cultivo padrão *Dulbeccco's Modified Eagle Medium* (DMEM) livre de fenol vermelho e com baixa concentração de glicose, contendo 100 U/mL penicilina (Sigma), 100 µg/mL estreptomicina (Sigma), 2,5 µg/mL anfotericina, 50 µg/mL ácido ascórbico (Sigma) e 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Sigma) por 10 minutos. Após este processo, a solução foi novamente centrifugada 1000 rpm por 5 minutos e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultivo padrão. As células viáveis foram contadas em uma câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão com azul de Tripan e, em seguida, semeadas em placas na concentração adequada de acordo com o experimento para o qual seriam destinadas: 2×10^5 células em placas de 35 mm de diâmetro para imunofluorescência; 5×10^5 células/placa de 6 poços para Western Blot e 1×10^5 células/placa de 24 poços para qPCR.

3.6.1.4 Manutenção das culturas de células decíduais antimesometriais

Após terem sido semeadas, as placas contendo as células decíduais foram mantidas em estufa úmida a 37 °C, 95% ar e 5% CO₂ por 3 h, quando destinadas para os experimentos de qPCR ou Western Blot, e por 5 h quando cultivadas em lamínulas de vidro para os estudos de imunofluorescência. As células não aderidas foram removidas por meio de lavagens com PBS 1X estéril suplementado com antibiótico e antifúngico. Em seguida foi adicionado meio padrão fresco nas placas.

Após 17 h de cultivo as células das placas ou das lâminas foram observadas em um microscópio invertido, quanto à morfologia geral, presença de células mortas e de contaminação bacteriana. Em seguida, as amostras foram lavados com PBS 1X

estéril contendo antibióticos e antifúngicos e o meio de cultura foi trocado por um meio fresco sem soro fetal bovino, composto de DMEM com MCDB-105 em uma mistura 3:1 suplementada com 100 u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2,5 µg/mL anfotericina, 5 µg/ml insulina bovina, 10 µg/ml transferrina humana, 50 µg/ml ácido ascórbico e 1mg/ml albumina de soro bovino (Gu, Gibori, 2006).

Cinco horas após as células decíduais serem cultivadas sem soro, o meio foi substituído por meio suplementado com hormônios.

3.6.2 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade, as células decíduais foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) e as análises de viabilidade foram feitas 24 e 48 h após tratamento com meio fresco, sem hormônios ou acrescido com estrógeno (E2) ou medroxiprogesterona (MPA) em três concentrações diferentes E2: 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL e MPA: 50 mg/mL; 5 mg/mL; 1 mg/mL). Foi adicionado 10 µl de MTT em cada um dos poços, que, em seguida, foram incubados por 3 h em estufa a 37 °C. Em seguida essa solução foi substituída por 100 µl de solução de solubilização de MTT (10% Triton X-100, 0.1 N HCl em isopropanol anidro) e as células foram aí mantidas por 30 min.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Epoch, BioTeck) calibrado em 560 nm. Todos os grupos tiveram um n=5 e os experimentos foram realizados em triplicatas. A análise estatística entre os grupos foram realizadas utilizando Two-way (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0.05$).

3.6.3 Curva de crescimento

Para dar suporte ao teste de viabilidade celular, foram realizadas contagens de células com auxílio do corante azul de Tripán, que permite uma análise quantitativa das células em suspensão. As células foram cultivadas em placas de 24 poços (9×10^4 células/poço), e as contagens ocorreram nos mesmos períodos dos testes de viabilidade celular, descritos anteriormente. Entretanto, apenas uma concentração foi utilizada para cada hormônio. A concentração escolhida foi a que apresentava viabilidade semelhante àquela encontrada no grupo controle (10 µg/ml

de estradiol-17 β e 5 mg de medroxiprogesterona). As suspensões de células foram obtidas por meio da tripsinização dos poços com 100 μ L tripsina /EDTA. Esta, posteriormente foi inativada com o próprio meio de cultura contendo 10% Soro (800 μ L) e com a adição de 100 μ L de azul de Tripán. As Suspensões obtidas de cada um dos tratamentos foram analisadas em câmara de Neubauer.

3.6.4 Meios suplementados com hormônios

A partir das avaliações realizadas (viabilidade celular e curva de crescimento) foram determinadas as concentrações hormonais utilizadas para o tratamento das culturas de células. Os cultivos foram lavados com PBS 1X estéril e, em seguida, algumas culturas foram imersas em meio fresco: o grupo controle foi cultivado em meio sem soro fetal bovino composto de uma mistura 3:1 de DMEM e MCDB-105, contendo 100 μ g/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina, 2,5 μ g/mL anfotericina, 5 μ g/ml insulina bovina, 10 μ g/ml transferrina humana, 50 μ g/ml ácido ascórbico e 1mg/ml albumina de soro bovino (Gu, Gibori, 2006), enquanto os grupos tratados tiveram o mesmo meio de cultivo que o controle, porém foram suplementado com 10 μ g/ml de estradiol-17 β ou com 5 mg/ml de medroxiprogesterona, um composto sintético com ação similar à progesterona. Os meios foram trocados a cada 24 h e as amostras foram coletadas após 24, 48 e 72 h de cultivo.

3.7 Imunofluorescência

Visando a caracterizar e confirmar se as culturas primárias obtidas continham apenas células decíduais como desejado, realizou-se a imunomarcagem para os filamentos intermediários desmina – um conhecido marcador de células decíduais - e também para vimentina – um marcador de fibroblastos.

3.7.1 Imunofluorescência para detecção dos filamentos intermédios desmina e vimentina

As células decíduais foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm na concentração de 2×10^5 células por mL durante 24, 48 e 72 h, na presença de meio sem soro (DMEM/MCDB-105;1:3) suplementados com hormônios (10 μ g/ml E2 ou 1

mg/ml MPA). Após os períodos correspondentes, as células cultivadas foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos em temperatura ambiente. O processo de imunomarcacão consistiu das seguintes etapas: (1) permeabilizacão das células com 0,1% Triton X-100 (Sigma) em PBS 1X por 10 minutos; (2) bloqueio dos sítios inespecíficos com soluçao de PBS/BSA 5%, por uma hora; (3) incubacão *overnight* a 4 °C, com anticorpo primário anti-desmina produzido em coelho (Abcam ab15200) na concentracão 1:250, diluído em PBS/Tween 0,03% ou com anticorpo primário anti-vimentina produzido em coelho (Abcam abc8545) *overnight*; (4) lavagem das lamínulas com PBS 0,1 M, pH 7,2; (5) incubacão por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fluoróforo FITC (F9887, Rockland, Gilbertsville, USA). Em seguida as lamínulas foram lavadas sequencialmente com PBS 1X e água destilada e montadas em meio aquoso contendo DAPI. Os controles da especificidade da reacão foram realizados pela substituiçao do anticorpo primário por soro não imune. Como controle positivo para vimentina e negativo para desmina foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E600).

3.7.2 Imunofluorescência para detecção dos receptores hormonais receptor de estrógeno (ER- α) e receptor de progesterona (PR)

Visando a conhecer se as células decíduais em cultura são responsivas a tratamento hormonal, Avaliou-se a expressao de receptores para estrógeno e progesterona. Para isso, as células decíduais foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm na concentracão de 2×10^5 células por 5 h, na presenç a de meio livre soro (DMEM/MCDB-105;1:3). O protocolo foi semelhante ao utilizado para a imunomarcacão para desmina e vimentina. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anticorpo policlonal anti-receptor de estrógeno α produzido em coelho (SC-7207, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) na concentracão 1:50 ou anticorpo policlonal anti-receptor de estrógeno β (Ab3577, Abcam, Dallas, Texas, USA) e anticorpo anti-receptor de Progesterona (A e B) produzido em coelho (SC-538, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA).

3.7.3 Imunofluorescência para detecção dos proteoglicanos decorim e biglicam

As células decíduais foram cultivadas sobre lamínulas de vidro durante 24, 48 e 72 horas, na presença de meio sem soro (DMEM/MCDB-105; 1:3) e suplementados com hormônios (10 µg/ml de E2 ou 5 mg/ml MPA). Após o período correspondente, as células foram fixadas com metanol/paraformaldeído 4% gelado durante 10 minutos a -20 °C e submetidas aos seguintes procedimentos: (1) lavagem com PBS 1X ; (2) incubação com condroitinase ABC (0,2 U/mL, em tampão tris-HCL 20 mM) durante 20 minutos a 37 °C; (3) bloqueio dos sítios inespecíficos por meio de incubação em uma solução de soro de cabra a 10% em PBS/BSA 5% por 1 hora; (4) incubação *overnight* a 4°C, com anticorpo primário anti-decorim de camundongo produzido em coelho (LF-113) ou anti-biglicam de camundongo feito em coelho (LF-159) diluídos 1:1000 em solução 0,03% Tween 20 em PBS; (5) revelação da imunorreação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com fluoróforo FITC (F9887, Rockland, Gilbertsville, USA) por 1 h. As lamínulas foram incubadas com DAPI (KPL, Gaithersburg, USA) diluído em PBS 1:200 por 10 min. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas com meio de montagem aquoso (KPL). Os controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário ou por soro não específico. Como controles positivos para os proteoglicanos, cortes congelados de úteros de camundongo foram submetidos ao mesmo procedimento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E600).

3.8 Reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR)

Com o objetivo de conhecer o efeito no nível da expressão gênica dos hormônios ovarianos nas células decíduais em cultura foi coletado material para a realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Devido à insuficiência de material para a reação convencional, utilizou-se o kit Fast SYBER® Green cell-to Ct™ (Ambiom®, Austin, Texas, USA), que permite tanto a realização da transcrição reversa (RT) (síntese do cDNA) quanto da PCR em tempo real diretamente de lisados de cultura de células, sem que seja necessário o isolamento do RNA. Foram cultivadas 10⁵ células/poço. Após 24, 48 e 72 h de cultivo em meio com ou sem

hormônios ovarianos, as culturas foram processadas de acordo com a sugestão do fabricante. Os *primers* para decorim e biglicam utilizados para a qPCR foram previamente descritos em trabalhos anteriores do laboratório (Salgado et al., 2009) Tabela 5.

Para determinar as concentrações adequadas de células a serem utilizadas nos experimentos, foram seguidas as orientações do fabricante. Uma vez padronizadas as concentrações, foi utilizado o seguinte protocolo:

Protocolo de extração RNA/cDNA Kit Power SYBR®Green Cells-to CT

3.8.1 Lise das células

- a) Lavagem das células na placa de cultura com PBS gelado.
- b) Adição de 49,5 µl de solução de lise e 0,5 µl de DNase, misturando-se cinco vezes por meio de pipetação por sobe e desce.
- c) Incubação por 5 min a temperatura ambiente (19-25 °C).
- d) Adição 5 µl de solução “stop” e mistura da amostra, por cinco vezes, por meio de pipetação por sobe e desce.
- e) Incubação a temperatura ambiente por no máximo 20 min.

Obs. Quando não foi possível continuar o procedimento no mesmo dia, a reação foi parada neste ponto, congelando-se o lisado a -20 °C.

3.8.2 Transcrição reversa (RT)

1. Programação do termociclador para a RT: 60 min a 37 °C; 5 min a 95 °C; *hold* a 4 °C.
2. Montagem do master mix RT, que foi distribuído nos tubos de reação, de acordo com a tabela 3.

Tabela 1 - RT Master mix: 50 µl volume final da reação

Componentes	Cada reação
2X SYBERT®RT buffer	25 µl
20X RT Enzima Mix	2,5 µl
Nuclease-free water	7,5 µl
Volume final do Master Mix	35 µl

3. Adição de 15 microlitros do lisado o qual foi misturado cuidadosamente.
4. Execução do programa do termociclador.

Obs. Quando não foi possível dar continuidade ao procedimento no mesmo dia, a reação foi parada neste ponto, e as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C por alguns dias.

3.8.3 PCR em tempo real

Programou-se o instrumento *Step One Plus* nas condições que descritas na Tabela 2. As amplificações foram realizadas utilizando-se condições padrões de ciclagem, sendo 10 min a 95° C para ativação da enzima, 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 s. com anelamento nas temperaturas referentes ao primer.

Tabela 2 - Programa utilizado para qPCR

	Estagio	Repetições	Temperatura	Tempo
Ativação da Enzima (<i>Hold</i>)	1	1	95 °C	10 min
PCR (ciclos)	2	40	95 °C	15 sec
Curva de dissociação		3	<i>default</i>	

- a) Montou-se o coquetel de PCR, que foi distribuído na placa, obtendo-se as seguintes concentrações (tabela 3):

Tabela 3 - PCR configuração cocktail

Componentes	20 µl PCR's cada reação
Power SYBER® Green PCR Master Mix	12 µl
Forward & Reverse PCR Primers	0,8 µl c/u
Água Nuclease-free	5,4 µl
Volume Final	19 µl

Concentração final dos *primers* 200 nM.

b) Acrescentou-se as amostras de cDNA que foram cuidadosamente misturadas.
Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações dos componentes para uma reação

Componente	20 µl cada reação
PCR cocktail	19 µl
cDNA	1 µl

c) Foi corrida a qPCR

O método de análise $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado com o gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Mus musculus]) como normalizador. As curvas padrões foram realizadas para todos os transcritos a fim de comprovar a linearidade e eficiência de amplificação, utilizando-se diluições seriadas de cDNA. A Curva de dissociação foi realizada com os produtos de amplificação para se assegurar a temperatura de dissociação dos mesmos e a eficiência do *primers*. Como controle negativo foi utilizado um mix de amplificação completo no qual o cDNA foi substituído por água.

Tabela 5 - Sequência dos *primers*, suas temperaturas de anelamento (T) e dimensões do produto esperado

<i>Gene</i>	Gen Bank N	Sence 5' – 3' Forward	Antisence 5' -3' Reverse	Produto de (pb)	T
<i>Decorim</i>	NM_007833.4	TGCGATCCCTCAAGGTCTGCCT	TTGGCCAGACTGCCATTCTCCA	162 bp	80
<i>Biglicam</i>	NM_007542	AGGAGGCTTCAGGTTTCAG	TAGCAGTGTGGTGTTCAGG	171 bp	83
<i>GAPDH</i>	NM_008084.2	TCTGAGGGCCCCACTGA AG	AGGGTTTCTTACTCCTTGGA GG	221 bp	82

3.8.4 Análises estatísticas para qPCR

A quantificação relativa foi analisada estatisticamente com auxílio do software para análise da expressão relativa REST (©) Beta V1.9.12, 2009. O grupo de células controle de 0 h foi utilizado como amostra de referência, sendo considerado artificialmente como o calibrador. A amostra calibradora foi coletada ao fim das 5 horas de tratamento sem hormônio, antes de iniciar o tratamento, considerando-se esta como amostra de tempo zero.

3.9 Western blot

A técnica de *western blot* foi realizada para analisar se o tratamento com os hormônios modifica a expressão proteica das moléculas de matriz extracelular estudadas (DCN e BGN).

3.9.1 Extração dos proteoglicanos

As culturas primárias de células decíduais foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/poço e cultivadas por 24, 48 e 72 nas diversas condições de tratamento. Foi coletado o meio condicionado das células tratadas ou não com hormônios nos tempos já expostos acima, adicionando-se coquetel de inibidores de protease (contendo pepstatina, E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina, EDTA). Em seguida, as amostras foram congeladas à -80 °C até o momento do uso. Para a extração de proteoglicanos do meio condicionado, as macromoléculas do

sobrenadante foram precipitadas pela adição lenta (de 20 µl em 20 µl) de dois volumes de metanol, sob agitação. O precipitado formado após 18 horas a -20 °C foi coletado por centrifugação (13000 g, 10 minutos a 4 °C) e em seguida lavado com 500 µl metanol, e mais uma vez centrifugado a (13.000 g, 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e a amostra foi seca e, posteriormente, suspendida em 100 µl tampão de lise [(50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 150 mM NaCl; 2% Triton X-100] (Calabrese et al., 2011; Cataruzza et al, 2002). A quantificação das proteínas foi feita pelo método BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). As amostras foram tratadas com condroitinase ABC liase *overnight* a 30 °C em banho-maria. Na manhã do dia seguinte, as amostras foram esquentadas a 100 °C em banho seco, por 5 minutos para inativar a enzima. O volume de meio condicionado carregado em cada poço foi padronizado com base na quantificação proteica realizada com o intuito de controlar as flutuações na secreção de proteoglicanos (PGs) decorrentes de proliferação celular eventualmente induzida pelos hormônios. Em seguida, foram ressuspendidas em tampão de amostra, contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol).

3.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os proteoglicanos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE). Foram carregados 20 µg de proteína por poço. As amostras com tampão de amostra foram fervidas por dez minutos a 100 °C e aplicadas ao gel de 10% de poliacrilamida.

3.9.3 Immunoblot

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Thermo Scientific, Rockford, USA). As membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado diluído na concentração de 10% em 0,05% Tween-20 (TTBS) 30 minutos, e incubadas com anticorpos primários anti-decorim (de camundongo produzido em coelho [LF-113], anti-biglicam (de camundongo produzido em coelho [LF-159] – diluído 1:2000 em TTBS por 18 h a 4 °C. Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpo secundário policlonal anti-IgG

de coelho conjugado com peroxidase (Amersham, Buckinghamshire, UK), diluído 1:5000 em TTBS, por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação angular. Em seguida, as membranas foram lavadas com TTBS por 3 vezes, 10 minutos cada. O reagente de quimioluminescência (ECL Supersignal Western Pico, Kit, Thermo Scientific, USA Amersham) foi utilizado para revelar a reação em equipamento fotodocumentador.

Para possibilitar a marcação com diferentes anticorpos, as membranas foram submetidas ao processo de *stripping* utilizando-se a solução *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce) podendo então ser submetidas a novas marcações.

3.9.4 Análise Estatística

Foram realizadas comparações múltiplas (>2) pelo teste ANOVA seguidas do teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da matriz extracelular do deciduoma durante seu desenvolvimento

Postula-se que os principais moduladores da remodelação da MEC durante a decidualização são os hormônios ovarianos. Esse postulado, entretanto, foi obtido de estudos realizados em endométrio de útero grávido, portanto, portador de embrião. Visando a confirmar o papel dos hormônios ovarianos como coordenadores centrais desse processo de remodelação, nessa tese analisamos, por imunomarcagem, a distribuição de alguns membros da MEC no deciduoma, tendo como hipótese que sinais parácrinos oriundos do embrião poderiam colaborar com os hormônios, na remodelação da MEC do endométrio. Nesse estudo analisou-se a distribuição de quatro tipos de colágenos (I, II, IV, V), e de três proteoglicanos (decorin, biglicam e versicam). As análises foram realizadas na região antimesometrial do útero, do quinto ao oitavo dia de pseudogestação. Observou-se diferenças na distribuição da imunomarcagem de acordo com a molécula, a região do endométrio e, também, com o dia de pseudogestação analisados. Esses resultados (sumarizados na Tabela 8) foram comparados com aqueles obtidos na decídua em trabalhos anteriores do nosso laboratório, e serão discutidos no tópico posterior.

4.1.2 Colágeno tipo I

A imunorreação para o colágeno tipo I estava amplamente distribuída no endométrio. **No quinto dia** de pseudogestação, a marcação mostrou-se fraca na região de decídua madura e intensa na região de células pré-decíduais e não decidualizadas. O colágeno tipo I também foi localizado na região da membrana basal da cripta uterina. **No sexto e sétimo dia** de pseudogestação, a imunomarcagem foi observada como fibras espessas presentes nos reduzidos espaços extracelulares da região de células decidualizadas e pré-decíduais. Na região de células não decidualizadas a imunomarcagem ocupava inteiramente os amplos espaços extracelulares. Entretanto, **no oitavo dia** de pseudogestação, apenas traços de imunoreatividade foram observados em todas as regiões do endométrio. No miométrio, a imunomarcagem foi observada no tecido conjuntivo existente entre as camadas de músculo liso em todos os dias analisados e, também, em ambas as camadas musculares, entre os dias 6 e 8 da gestação (Figura 11).

Figura 11 - Imunofluorescência do colágeno tipo I na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5^o ao 8^o dia de pseudogestação (DPG), **Colágeno tipo I** (verde) e citoplasma corado com azul de Evans (vermelho). No **5^o DPG** observa-se intensa imunofluorescência na região subepitelial. Na região de decídua madura (RDM) a imunofluorescência é fraca tornando-se intensa na região de pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END); No **6^o DPG** o colágeno tipo I está presente em todas as regiões: região decídua madura (RDM) região de pré-decídua (RPD), no estroma não decidualizado (END) e nas camadas do miométrio interno (MI) e miométrio externo (ME); no **7^o DPG** a imunofluorescência é semelhante ao dia anterior, sendo intensa entre as células do estroma decidualizado (RDM), na pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END); no **8^o DPG** a imunofluorescência é intensa na região do epitélio e ausente na região de decídua madura (RDM), na pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END). No miométrio interno (MI) e externo (ME), entretanto, a imunofluorescência é intensa a partir do 6^o dia de pseudogestação.

4.1.3 Colágeno tipo III

O colágeno tipo III foi imunolocalizado conspicuamente no endométrio do **quinto ao sétimo dia** de pseudogestação. Inicialmente, foi detectado como uma rede de finas fibras distribuídas entre as células decíduais maduras e pré-decíduais, aumentando progressivamente em direção ao estroma não decidualizado entre o 5º e 6º dias da pseudogestação. No **oitavo dia** de pseudogestação, embora presente em todas as regiões analisadas, a intensidade da fluorescência estava fortemente diminuída quando comparada aos dias anteriores.

O colágeno tipo III é abundante entre os fascículos de tecido muscular no miométrio de ambas camadas musculares, bem como no tecido conjuntivo existente entre as camadas de músculo liso do miométrio durante todos os dias analisados (Figura 12).

4.1.4 Colágeno tipo IV

A imunomarcacão para colágeno tipo IV na região antimesometrial do **quinto ao oitavo dia** é restrita à membrana basal dos vasos sanguíneos e, aos epitélios glandular e luminal. No **sexto e oitavo dia** esse tipo de colágeno foi detectado como uma rede de fibras distribuídas entre as células decíduais maduras e pré-decíduais. No **oitavo dia** de pseudogestação, a imunofluorescência, embora menos intensa, ainda estava presente nas regiões de células decíduais maduras e pré-decíduais.

O colágeno tipo IV foi detectado em abundância entre os fascículos de músculo liso do miométrio em todos os períodos analisados (Figura 13).

Figura 12 - Imunofluorescência do colágeno tipo III na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5º ao 8º dia de pseudogestação (DPG), **colágeno tipo III** (verde), e citoplasma corado com azul de Evans (vermelho). No **5º DPG** observa-se imunofluorescência na região subepitelial, assim como uma fina rede rodeando as células deciduais maduras na região de decídua madura (RDM), a fluorescência se torna intensa na região de pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END). Forte imunorreação é vista no miométrio interno (MI) e externo (ME); No **6º DPG** o colágeno III está presente em todas as regiões, formando uma rede entre as células deciduais: região decídua madura (RDM) região de pré-decídua (RPD), no estroma não decidualizado (END) e nas camadas do miométrio interno (MI) e miométrio externo (ME); no **7º DPG** a imunomarcagem é semelhante ao dia anterior, imunofluorescência é observada entre as células do estroma decidualizado (RDM), intensa marcação na pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END); no **8º DPG** há uma intensa imunofluorescência na região do epitélio, porém na região abaixo do epitélio uma fraca marcação é observada. Uma rede fluorescente rodeia as células deciduais da região de decídua madura (RDM), na pré-decídua (RPD) e os fibroblastos do estroma não decidualizado (END). Forte imunofluorescência está presente no miométrio interno (MI) e externo (ME).

Figura 13 – Imunofluorescência do colágeno tipo IV na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5^o ao 8^o dia de pseudogestação (DPG). **Colágeno tipo IV** (verde), e citoplasma corado com azul de Evans (vermelho). No **5^o DPG** se observa imunofluorescência na membrana basal do epitélio de revestimento da luz uterina, assim como na membrana basal das glândulas e dos feixes do miométrio na camada interna (MI) e externa (ME); No **6^o DPG** a imunofluorescência é intensa na matriz extracelular das células decíduais próximas ao epitélio e na região de membrana basal dos vasos sanguíneos na região decídua madura (RDM). Uma fraca imunomarcagem é observada na região de pré-decídua (RPD), e no estroma não decidualizado (END). A imunofluorescência está limitada à região de membrana basal dos vasos sanguíneos e à membrana basal que rodeia os feixes musculares na camada interna (MI) e externa do miométrio (ME); no **7^o DPG** a imunorreação é semelhante ao dia anterior. Intensa fluorescência é observada na matriz extracelular das células decíduais próximas ao epitélio e na região de membrana basal dos vasos sanguíneos na região decídua madura (RDM) e na região de pré-decídua (RPD); no **8^o DPG** há fraca reação na região de decídua

madura (RDM), e na pré-decídua (RPD). A imunofluorescência permanece intensa na membrana basal dos feixes do miométrio, tanto na camada interna (MI) como na externa (ME).

4.1.5 Colágeno tipo V

No **quinto dia** de pseudogestação, a imunomarcção para o colágeno tipo V, foi discreta na região de células decíduas maduras e células pré-decíduais. No **sexto dia**, a imunofluorescência se manteve presente na e decídua madura, na pré-decídua, e no estroma não decidualizado. No **sétimo dia** de pseudogestação uma fraca imunorreação foi observada na região de decídua madura e de células pré-decíduais. No **oitavo dia** a imunofluorescência estava ausente de todas as regiões do endométrio. O colágeno tipo V foi imunodetectado durante todos os dias analisados na região da membrana basal do epitélio luminal e entre os fascículos de células musculares lisas do endométrio (Figura 14).

4.1.6 Decorim

Do **quinto ao oitavo dia** de pseudogestação, a imunomarcção para o proteoglicano decorim foi restrita à região não decidualizada próxima do miométrio, rodeando os fibroblastos endometriais, as glândulas e os vasos sanguíneos.

Uma intensa marcação foi observada no tecido conjuntivo localizado entre as camadas de músculo liso do miométrio (Figura 15).

4.1.7 Biglicam

No **quinto** e no **sexto dia** de pseudogestação, o proteoglicano biglicam foi imunodetectado no citoplasma das células decíduas maduras, pré-decidualizadas e não decidualizadas. No **sétimo e oitavo dia**, além de estar presente nas mesmas regiões observadas nos dias anteriores, o biglicam também foi detectado como fibras entre as células decíduas maduras e pré-decíduais. Em todos os dias analisados, a imunomarcção foi observada rodeando os vasos sanguíneos e as camadas musculares do miométrio (Figura 16).

Figura 14 - Imunofluorescência de colágeno tipo V na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5^o ao 8^o dia de pseudogestação (DPG). **Colágeno tipo V** (verde) e citoplasma corado com azul de Evans (vermelho). No **5^o DPG** na região de decídua madura (RDM) e na região de pré-decídua uma fraca imunofluorescência é observada (RPD), não há marcação no estroma não decidualizado (END) e uma fraca imunofluorescência está presente no miométrio interno (MI) e externo (ME); No **6^o DPG** a imunofluorescência está presente na região sub-epitelial assim como entre as células deciduais: região decídua madura (RDM), região de pré-decídua (RPD), tornando-se mais intensa a marcação no estroma não decidualizado (END) e nas camadas do miométrio interno (MI) e miométrio externo (ME); no **7^o DPG** a imunomarcação está ausente na região de decídua madura (RDM) e na pré-decídua (RPD), porém no estroma não decidualizado (END) e nas camadas de miométrio interno (MI) e externo (ME) apresentam positividade de marcação; no **8^o DPG** há intensa marcação na região do epitélio, porém está ausente na região de decídua madura (RDM), na pré-decídua (RPD) e no estroma não decidualizado (END), porém ainda se observa imunomarcação a no miométrio interno (MI) e externo (ME).

Figura 15 - Imunoperoxidase para localização de decorim na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5º ao 8º dia de pseudogestação (DPG). No **5º DPG** não se observa imunorreação na região de decídua madura (RDM), nem na região de pré-decídua (RPD). Imunorreação está presente no estroma não decidualizado (END) e no tecido conjuntivo entre as camadas musculares, muscular interna (MI) e muscular externa (ME). O mesmo padrão de imunomarcacão permanece sendo observada no **6º, 7º e 8º DPG**.

Figura 16 - Imunoperoxidase para identificação de biglicam na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação, do 5º ao 8º dia de pseudogestação (DPG). No **5º DPG** biglicam é observado no citoplasma das células decíduas na região de decídua madura (RDM), assim como na região de pré-decídua (RPD), no estroma não decidualizado (END) e no tecido conjuntivo entre a camada muscular interna (MI) e externa (ME). No **6º DPG** a imunomarcagem é ubíqua em todas as regiões do útero; no **7º DPG** a imunomarcagem continua amplamente distribuída e é possível observar a formação de estruturas fibrilares entre as células decíduais na região de decídua madura (RDM) e pré-decídua (RPD); no **8º DPG** a imunomarcagem diminui e já não é observada no citoplasma das células decíduais da região de decídua madura (RDM), entretanto, ainda são observados traços de reação na região pré-decidual (RPD) assim como fibras imunorreativas entre as células decíduais. No estroma não decidualizado (END) e no tecido conjuntivo entre as camadas musculares, a marcação é intensa.

4.1.8 Versicam no decíduoma

No **quinto dia** de pseudogestação, a imunomarcagem para o proteoglicano versicam, está amplamente distribuída em todas as regiões do útero, sendo

observada no citoplasma das células decíduas maduras, pré- decíduas e nos fibroblastos do estroma não decidualizado. No **sexto dia** de pseudogestação a imunomarcação é significativamente reduzida e, apenas traços de versicam são observados no citoplasma das células decíduas maduras. Houve também, uma diminuição da imunomarcação na região de pré-decídua. No **sétimo dia** de pseudogestação apenas traços de imunorreacção foi observado no citoplasma das células pré-decíduas enquanto uma intensa imunomarcação permanece na região de estroma não decidualizado. O versicam também foi detectado nas células musculares lisas da camada muscular interna. No **oitavo dia** o versicam estava ausente na região de decídua madura, pré-decídua e nas camadas muscular interna e externa. Entretanto, uma intensa marcação foi observada na região do estroma não decidualizado e no tecido conjuntivo entre as camadas muscular interna e externa do miométrio (Figura 17).

4.1.9 Distribuição de versicam na decídua

Resultados prévios do nosso laboratório identificaram o versicam na região de células decíduas maduras e células pré-decíduas. A marcação para esse proteoglicano foi discreta na região de células não-decidualizadas (San Martin et al., 2003). No presente estudo, entretanto, o versicam foi detectado na região não decidualizada e pré-decídua, e alguns traços na região de células decíduas maduras. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que no presente estudo foi utilizado um anticorpo distinto daquele utilizado nos estudos de San Martin. O anticorpo utilizado neste estudo reconhece apenas as isoformas V0 e V1, aquelas que contem o domínio β -GAG no seu eixo proteico, enquanto o anticorpo utilizado nos estudos anteriores era direcionado contra um peptídeo presente em todas as isoformas de versicam humano. Para permitir a comparação com os estudos de San Martin, realizamos um novo estudo em decídua. Observamos que a imunomarcação para o versicam estava amplamente distribuída na região antimesometrial da decídua no **quinto e sexto dia** de gestação e estava localizada no citoplasma das células decíduas maduras, pré-decíduas e nos fibroblastos do estroma não decidualizado. No **sétimo e oitavo dia** o versicam estava ausente nas regiões decidualizadas, enquanto o estroma não decidualizado se mantinha intensamente imunorreativo. Imunorreacção para o versicam foi também observada, do quinto ao

sétimo dia de gestação, no tecido conjuntivo presente entre as células musculares lisas da camada muscular interna miométrio (Figura 18).

Figura 17 - Imunoperoxidase para versicam na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5º ao 8º dia de pseudogestação (DPG). No **5º DPG**, a imunorreação é observada no citoplasma das células decíduais na região de decídua madura (RDM), assim como na região de pré-decídua (RPD), no estroma não decidualizado (END) e no tecido conjuntivo entre a camada muscular interna (MI) e externa (ME). No **6º DPG** o padrão de marcação é idêntico ao do dia anterior, nota-se, porém, maior intensidade na reação na matriz que rodeia as células decíduais na região pré-decidual (PDR); no **7º DPG**, a imunorreação não é observada na região de decídua madura (RDM), porém é observada no citoplasma de algumas células decíduais na pré-decídua. Intensa marcação é observada no tecido conjuntivo do estroma não decidualizado (END) e naquele situado entre as camadas musculares. No **8º DPG**, a imunorreação diminui e já não é mais observada no citoplasma das células decíduais da região de decídua madura (RDM) nem da região de pré-decídua (RPD); no estroma não decidualizado (END) a imunorreação é intensa assim como no tecido conjuntivo entre as células da camada muscular interna (MI) e externa (ME).

Figura 18 - Imunoperoxidase para versicam na decídua antimesometrial.

Cortes transversais de sítios de implantação da região antimesometrial, do 5º ao 8º dia de gestação (DOP). No **5º DOP**, o versicam é observado no citoplasma das células deciduais na região da decídua madura (RDM), assim como na região de pré-decídua (RPD), no estroma não decidualizado (END) e nas células da camada muscular interna (MI). No **6º DOP** há uma diminuição na imunomarcagem na região de decídua madura, entretanto, a imunorreação persiste na matriz que permeia as células deciduais na região pré-decidual (PDR), no estroma não decidualizado e na camada muscular interna (MI); no **7º DOP** a imunomarcagem está ausente da região de decídua madura (RDM), porém permanece na no citoplasma de algumas células deciduais da pré-decídua. Uma intensa imunorreação é observada no tecido conjuntivo do estroma não decidualizado (END). Algumas células da camada muscular interna mostram-se imunorreativas; no **8º DOP** a imunomarcagem diminui e já não é mais observada no citoplasma das células deciduais das regiões de decídua madura (RDM) e pré-decídua (RPD) permanecendo no estroma não decidualizado (END).

A tabela 6 resume os resultados do estudo da distribuição de moléculas da MEC na região antimesometrial de deciduoma induzido em camundongos fêmeas pseudogravídas.

Tabela 6 - Distribuição dos colágenos e proteoglicanos no decíduoma

Dia pseudogestação	5			6			7			8		
	RDM	RPD	END	RDM	RPD	END	RDM	RPD	RND	RDM	RPD	RND
Colágeno I	+	++	++	+	++	++	++	++	++	-	+	+
Colágeno III	+	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+	+	+
Colágeno IV	-	-	-	++	+	+	++	++	-	+	+	+
Colágeno V	+	+	+	+	+	++	+	+	+	-	-	+
Decorin	-	-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Biglicam	+	+	++	++	++	++	++	+++	++	+	++	+++
Versicam	++	++	+	+	++	+	+	+	++	-	-	+++

RDM: região decídua madura; RPD: região pré-decídua; END: estroma não decidualizada.

Distribuição: (-) = ausente; (+) = pouca; (++) = moderada; (+++) = abundante.

4.2 Análise do perfil hormonal durante a gestação e pseudogestação em camundongos

4.2.1 Esfregaço vaginal

As mudanças que ocorrem no epitélio vaginal, no influxo de células imunes e na produção de muco pela influência do estrógeno, permitem distinguir os diferentes estágios do ciclo estral. Dessa forma, a análise do conteúdo vaginal constitui-se em um método fácil e não invasivo, para se observar a influência dos hormônios ovarianos no trato reprodutivo. Após a ovulação e durante o início da gestação, os níveis de estrógeno se encontram diminuídos e os níveis de progesterona predominam. Com o intuito de validar a existência de similaridade entre o perfil hormonal de fêmeas grávidas e pseudográvidas, realizamos um estudo comparativo da citologia vaginal do segundo ao oitavo dia de gestação e de pseudogestação.

Observamos que os esfregaços vaginais de camundongos fêmeas grávidas e pseudográvidas apresentam as mesmas características citológicas e tintoriais. Os esfregaços foram realizados a partir do segundo dia de gestação ou pseudogestação, após a observação da presença da rolha vaginal. No **segundo dia após o coito**, os esfregaços apresentaram um perfil semelhante ao observado durante o metaestro contendo abundantes polimorfos nucleares, células epiteliais

cornificadas anucleadas e, algumas vezes, células epiteliais nucleadas. Do **terceiro ao quinto dia após o coito**, os esfregaços vaginais apresentaram componentes que lembram a fase de metaestro, porém, células epiteliais cornificadas anucleadas raramente foram observadas. Nesse período, a quantidade das células epiteliais nucleadas foi maior que no anterior. O núcleo de muitas destas células mostrava-se fragmentado (cariorrhexis) e o citoplasma se apresentava avermelhado, indicando o acúmulo de queratina. Do **sexto ao oitavo dia após o coito**, o perfil citológico dos esfregaços mudou. Ao invés de células epiteliais queratinizadas anucleadas existiam abundantes células epiteliais nucleadas, a maioria das quais apresentavam citoplasma corado em vermelho, indicativo de acúmulo de queratina, indicando que descamaram das camadas mais superficiais do epitélio vaginal. Também foi possível observar células epiteliais nucleadas com citoplasma coradas em ciano indicando a origem do estrato basal do epitélio. Leucócitos polimorfos nucleares eram abundantes. Cabe destacar que, nestes dias, o muco se torna persistente nos esfregaços, sendo observado na tonalidade ciano (Figura 19).

4.2.2 Análise do corpo lúteo

Os ovários de fêmeas grávidas e pseudográvidas do 5º ao 8º dia pós-coito foram coletados (n=5 por dia) com o objetivo de quantificar e comprar o número de corpos lúteos nesses dois grupos de animais. Durante a contagem do número de corpos lúteos presentes, observamos que, no **5º dia**, os ovários das fêmeas pseudográvidas apresentam um número ligeiramente maior de corpos lúteos do que o observado em fêmeas grávidas. Nos **dias 6º e 7º** pós-coito, o número de corpos lúteos foi semelhante em ambos os grupos. No **8º dia** pós-coito, entretanto, o número de corpos lúteos foi ligeiramente menor nos ovários de fêmeas pseudográvidas (Tabela 7; Figura 20).

No 5º dia pós-coito, as fêmeas pseudográvidas tinham um número maior de corpos lúteos quando comparado com as fêmeas grávidas, porém, no 8º dia pós-coito, o número de corpos lúteos foi menor quando comparado com aquele observado em fêmeas grávidas. Esse resultado sugere que os corpos lúteos das fêmeas pseudográvidas sofram um processo de regressão mais rápido. A análise estatística paramétrica do tipo test T-Student, entretanto, não identificou diferença significativa entre os corpos lúteos oriundos dos dois grupos de animais. De fato,

não detectou-se nenhuma interferência no desenvolvimento do decíduoma como também não foram observadas diferenças na citologia vaginal entre animais grávidos e pseudográvidos.

Figura 19 - Esfregaços vaginais de camundongos fêmeas grávidas e pseudográvidas do 2º ao 8º dia pós-coito.

O perfil citológico de esfregaços vaginais coletados de fêmeas grávidas e pseudográvidas nos mesmos períodos pós-coito são semelhantes. Do **2º ao 5º dia pós-coito**, os esfregaços apresentam perfil semelhante ao observado na fase de metaestro do ciclo estral, com células anucleadas e queratinizadas (setas espessas), células nucleadas (asteriscos) e polimorfos nucleares (setas finas). Do **6º ao 8º dia pós-coito** o perfil muda em ambos os grupos e, nos esfregaços predominam, um grande número de polimorfos nucleares (setas finas), células nucleadas intermediárias e muco corado em ciano.

Tabela 7 - Análise quantitativa dos corpos lúteos (n=5).

Dia pós-coito	Fêmeas grávidas Nº Corpos Lúteos	Fêmeas pseudográvidas Nº Corpos Lúteos
5º	10	12
6º	7	7
7º	8	10
8º	8	6

Figura 20 - Ovários de fêmeas grávidas e pseudográvidas do quinto ao oitavo dia pós-coito.

Os corpos lúteos são vistos como estruturas ovoides fortemente eosinófilas (*).

4.3 Estabelecimento de culturas primárias de células deciduais do endométrio de camundongos fêmeas

O segundo conjunto de resultados dessa tese foi obtido com o objetivo de avaliar a ação dos hormônios E2 e MPA sobre síntese e secreção de moléculas da MEC por células deciduais antimesometriais. Para este fim, células deciduais, obtidas de decíduoma no sétimo dia de pseudogestação foram isoladas e cultivadas em meio de composição conhecida livre de hormônios ovarianos.

O modelo de pseudogestação e decíduoma foi utilizado como fonte de células deciduais com o objetivo de evitar a contaminação da cultura com células

embrionárias e, também, porque o decíduoma, por ser mais desenvolvido que a decídua, fornece um maior número de células decíduais. Utilizou-se como base protocolos previamente desenvolvidos no laboratório. Entretanto, algumas adaptações foram introduzidas uma vez que os protocolos existentes no laboratório incluíam a utilização de meio de cultivo DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O SFB contém fatores de crescimento e hormônios que poderiam interferir nos resultados.

4.3.1 Cultura primária de células decíduais antimesometriais de camundongos cultivadas em meios suplementados com hormônios

Diversos protocolos foram testados. Inicialmente observamos que, uma vez isoladas, as células decíduais para sobreviver, precisam permanecer pelo menos 12 horas em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (SFB). Após esse período, as células decíduais mantiveram-se viáveis sem a presença de SFB. Deste modo, o protocolo adotado consistiu no isolamento das células decíduais e posterior cultivo em DMEM 10% soro fetal bovino por três ou cinco horas. Em seguida, as células foram lavadas com solução de PBS 0,1 M pH 7,2 (para permitir a eliminação de células não aderidas e mortas). Em seguida, o meio foi substituído por meio fresco (DMEM10% SFB), e as células foram mantidas nessa situação por 12 h. Após esse processo, as células foram lavadas com PBS e o meio foi trocado por DMEM/MCDB-105 privado de soro, no qual foram mantidas por 5 h. Por fim, o meio foi trocado por DMEM/DCDB-105 privado de soro mas, suplementado com hormônios (E2 ou MPA). Como controle utilizou-se meio privado de soro e de hormônios. Os grupos analisados receberam o tratamento com hormônio durante os períodos de 24, 28 e 72 h (Figura 21).

Figura 21 - Representação esquemática do procedimento para o isolamento de células decidualizadas do decíduoma de sétimo dia, e posterior processamento.

Na manhã em que se observa a presença de rolha vaginal é considerado como o primeiro dia de pseudogestação (dpg). No 4º dia de pseudogestação realizou-se injeção de óleo no lúmen dos cornos uterinos. No 7º dia foram coletados os cornos uterinos decidualizados. A região coletada (região pontilhada), após ser submetida à digestão enzimática, foi utilizada para a separação das células deciduais, as quais foram tratadas por 12 h com meio de cultura contendo 10% de SFB. Em seguida, as células foram lavadas e mantidas em meio privado de soro, por 5 h antes de se iniciar o tratamento hormonal com estrógeno (E2) ou medroxiprogesterona (MPA), por 24, 48 ou 74. Após os períodos de incubação, as células e o meio condicionado foram coletados, e submetidos às diferentes análises (western blot, qPCR, imunofluorescência). SI: sitio interimplantação; M=mesometrial; AM=antimesometrial.

4.3.2 Teste de viabilidade por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

O teste de viabilidade com MTT teve como objetivo identificar a dose adequada de hormônio a ser utilizada no meio de cultivo, visando a tornar a viabilidade das células tratadas com hormônios semelhante àquela do grupo controle (sem hormônios). Para isso, foram avaliados os resultados obtidos da incubação das células com três doses diferentes de cada hormônio.

Esse teste é feito pela mensuração do dano induzido pelo composto em estudo (no caso os hormônios) no metabolismo celular de glicídeos por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. Com este teste foi possível determinar as concentrações adequadas de hormônios a serem utilizadas nas culturas celulares.

A figura 22 mostra os dados obtidos com as culturas tratadas com hormônios por 24 e 48 h. No período de 24 h houve diferença estatisticamente significativa entre as culturas controles e algumas culturas tratadas com hormônios. Os dados das culturas tratadas com as diversas concentrações de hormônio por 48 h mostram, também, que houve diferenças significativas entre algumas das doses utilizadas de hormônios e as culturas controles. A dose de 10 µg/mL de estrógeno e a dose de 5 mg/mL de medroxiprogesterona foram as doses selecionadas por não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas com as culturas controles, quer com 24 quer com 48 h de tratamento.

Figura 22 - Ensaio de MTT para determinação da dose de hormônio adequado para tratamento das células decíduais *in vitro*

As únicas doses que não apresentam diferença estatisticamente significativa são as: E2: [10 µg/mL] e MPA [5 mg/ml] tanto em 24 quanto em 48 horas. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

4.3.3 Caracterização das culturas de células decíduais antimesometriais

4.3.3.1 Morfologia

As células decíduais cultivadas por 24 h sem tratamento hormonal (controle) exibiram uma morfologia variada. A maioria das células era poligonal, algumas arredondadas e raras células eram fusiformes. Células mononucleadas ou multinucleadas encontravam-se presentes contendo nucléolos bem evidentes. As células tratadas com E2 exibiram uma predominância de células poligonais, uni ou multinucleadas com nucléolos evidentes. As células tratadas com MPA exibiram um padrão semelhante ao observado nas culturas de células controle (Figura 23). Após 48 h, as células do grupo controle ou tratados com hormônios E2 ou MPA eram, na maioria, poligonais e estabeleciam contato entre elas por meio de pequenas projeções citoplasmáticas; os nucléolos eram evidentes. Algumas células multinucleadas foram observadas (Figura 23). Após 72 h de tratamento, as células controles e tratadas com E2 ou MPA mostraram um padrão semelhante ao encontrado em 48 h, porém, em algumas culturas, as células perderam a inibição do crescimento por contato célula-célula observando-se sobreposição (Figura 23).

Observou-se, que as células decíduais antimesometriais, tanto as controles quanto as tratadas com E2 ou MPA, exibiram as características morfológicas observadas nas células decíduais antimesometriais de camundongos *in vivo*: células grandes globosas, volumosas, com vários núcleos e nucléolos proeminentes. Curiosamente, as células tratadas com E2 eram menores e de formato poligonal do que aquelas tratadas com MPA ou as controles.

Figura 23 - Morfologia das células decíduais tratadas com E2 e MPA por 24, 48 e 72 h *in vitro*.

Observa-se que as células decíduais tratadas com hormônios mantêm as características morfológicas observadas *in vivo*: células grandes globosas (asterisco), núcleos proeminentes (cabeça de seta) e multinucleadas (seta).

4.3.3.2 Imunolocalização de Desmina, um marcador de decidualização

A desmina é uma proteína que compõe os filamentos intermediários do citoesqueleto celular. Foi o primeiro marcador molecular identificado para a decidualização (Glasser, Julian, 1987). Portanto, a imunomarcação da desmina foi utilizada para verificar pureza do material cultivado e a manutenção do fenótipo decidual em cultivo, e a influência dos hormônios na expressão de desmina. Após o isolamento, a grande maioria das células (96%), foram imunorreativas à desmina, (Figura 24). Em adição, tanto as culturas controle quanto as tratadas com hormônios, foram positivas para este filamento intermediário em todos os tempos estudados (Figura 25). Após 24 h de cultivo as células apresentaram uma intensa imunofluorescência em forma de “capuz”, rodeando o núcleo, como já descrito anteriormente em outros estudos *in vivo* realizados pelo nosso laboratório

(Oliveira et al., 2000). Os filamentos de desmina espalham-se pelo citoplasma a partir da região perinuclear. Após 48 horas de cultivo, a distribuição de desmina muda formando uma rede distribuída por todo o citoplasma das células. Algumas células ainda mantinham imunofluorescência em forma de “capuz” rodeando os núcleos das células binucleadas, principalmente nas culturas tratadas com E2 ou MPA. Nas culturas não tratadas de 72 horas, os filamentos de desmina se concentram na região periférica do citoplasma, enquanto, nas células tratadas com E2 ou MPA os filamentos se espalham por todo o citoplasma (Figura 25).

Figura 24 - Imunofluorescência para desmina em células decíduais cultivadas sem tratamento hormonal.

Células decíduais cultivadas em lamínulas de vidro por 17 h. Observa-se uma extensa rede de filamentos de desmina (verde) em todo o citoplasma da célula, núcleo (azul). Escala 50 µm.

Figura 25 - Imunofluorescência para desmina em células decíduais cultivadas em lamínulas de vidro e tratadas com E2 e MPA por 24, 48 e 72 h.

Observa-se que as células decíduais controle e tratadas com hormônios ovarianos são imunorreativas para desmina (verde). Após 24 horas de tratamento a desmina pode ser observada como um capuz (seta) rodeando os núcleos das células; após 48 horas, a imunofluorescência se espalha pelo citoplasma das células; após 72 h, a imunofluorescência apresenta é observada na periferia celular e algumas células conservam o capuz imunofluorescente na região perinuclear (seta).

A observação microscópica qualitativa indicava que o tratamento com hormônios aumentava a imunomarcção para a desmina. Para confirmar essa observação porcentagem da área marcada de cada célula decidualizada (n=12 a 17) foi mensurada com o auxílio do programa *Image J*. A análise estatística das porcentagens de área imunofluorescente confirmou, que as células tratadas com hormônios, E2 ou MPA, apresentam maior área ocupada por desmina do que as células das culturas controle, em todos os tempos estudados. As células sem tratamento hormonal apresentam uma porcentagem de área marcada de 36 a 51% enquanto as células tratadas com E2 apresentam porcentagem de 49 até 73% e as

tratadas com MPA apresentam uma porcentagem de área marcada entre 51 a 73%. A área imunorreativa à desmina aumentou ao longo do tempo tanto nas células controle quanto as tratadas com hormônios (Figura 25). Entretanto, a porcentagem de área ocupada pela desmina em culturas controles foi menor quando comparada com as culturas tratadas com hormônios (E2 ou MPA): após 24 horas de tratamento $p < 0,01$ e após 48 e 72 horas foi $p < 0,001$. Não houve, entretanto, diferença estatisticamente significativa na área imunofluorescente quando se compara células tratadas com E2 com as tratadas com MPA (Figura 26).

Estes resultados nos mostram que a produção de filamentos de desmina nas células decidualizadas da região antimesometrial é mediada pelos hormônios esteroides. A imunomarcção para vimentina, um filamento intermediário característico de células mesenquimais, como os fibroblastos, dos quais derivam as células decidualizadas mostrou, que após a decidualização, o fibroblasto endometrial mantém filamentos de vimentina, porém passa a expressar também filamentos de desmina. Nossas culturas mantiveram o padrão relatado na literatura para células deciduais *in situ* (Figura 27) (Glasser et al., 1987)

Figura 26 - Quantificação da porcentagem de área celular imunofluorescente para desmina nas células deciduais cultivadas *in vitro* e tratadas com os 10 µg/mL de E2 e 5 mg/mL de MPA.

Após 24 h de cultivo, a porcentagem de área marcada, quando comparada com o controle, é maior para as culturas de células tratadas com E2 ($p < 0,05$) ou MPA ($p < 0,01$); em 48 h e 72 h, tanto as culturas tratadas com E2 ou MPA apresentam maior área marcada quando comparadas com o controle ($p < 0,001$). (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

Figura 27 - Imunofluorescência para Vimentina nas células cultivadas *in vitro*.

A) controle positivo, fibroblastos marcados com anticorpo anti-vimentina (verde); B) controle negativo (omissão de anticorpo primário); C) células decidualizadas apresentam uma fraca imunofluorescência para vimentina. Escala de barra: 100 µm.

4.3.3.2 Imunolocalização de receptores hormonais, ER α e PR em cultura de células deciduais antimesometriais.

Visando verificar se as células deciduais em cultura seriam responsivas aos hormônios com os quais seriam tratados (E2 e MPA), os receptores cognatos destes hormônios foram identificados por imunofluorescência. Para isso, as células deciduais foram cultivadas por 17 horas em meio livre de hormônios sendo, após este período, fixadas em paraformaldeído 4%. Realizou-se a imunodeteção dos seguintes receptores: (i) ER- α , a forma do ER mais abundante na decídua, (ii) ER- β e (iii) PR (PR-A + PR-B). Verificou-se que os três grupos de receptores estavam sendo expressos pelas células deciduais antimesometriais em cultura. A maioria das células apresentava imunoreatividade ao ER- α e PR (Tabela 10). Estes resultados indicam que as células deciduais mantêm a capacidade de responder à estimulação por E2 e MPA em cultivo (Figura 27; Tabela 10).

Figura 28 - Imunofluorescência para os receptores hormonais nas células decíduais antimesometriais cultivadas *in vitro*.

Fotomicrografia das células decíduais cultivadas em lamínulas de vidro. Observa-se que as células decíduais mantêm receptores nucleares ER- α e ER- β , assim como PR-AB após cinco horas de cultivo em meio privado dos hormônios E2 e P4.

Tabela 8 - Porcentagem de células decíduais antimesometriais positivas para a marcação de receptores hormonais.

Receptor	% de células positivas
ER- α	81
ER- β	26
PR (PR-A + PR-B).	87

4.4 Efeito dos hormônios ovarianos nas células decíduais antimesometriais de deciduoma sobre a expressão de moléculas da MEC.

4.4.1 Biomodulação da expressão gênica do BGN e DCN em células decíduais antimesometriais tratadas com o MPA e 17 β -Estradiol.

Os níveis de expressão gênica do biglicam mostram a tendência deste proteoglicano ser mais expresso nas células tratadas com MPA. Após **24 h** de cultivo, a expressão de BGN pelas células com e sem tratamento com E2 são similares. Já em culturas de **48 h**, a expressão de biglicam é mais alta em células controles do que em células tratadas com E2 ou MPA. Nesse mesmo período, entretanto, a expressão de BGN é maior nas células tratadas com MPA quando comparada com as tratadas com E2. Após **72 h** de cultivo, a expressão de BGN decresce nos três grupos estudados (controle; E2 e MPA). Contudo, biglicam continua sendo mais expresso em células tratadas com MPA (Figura 29).

Figura 29 - Expressão gênica de BGN estimada em relação à expressão de GAPDH por qPCR em células tratadas por E2 ou MPA por 24, 48 ou 72 horas.

C: controle; E2: estrógeno; MPA: medroxiprogesterona. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

Os níveis de expressão gênica de decorim (DCN) tendem a ser maiores nas células tratadas com E2. Após **24 h** de cultivo, a expressão de DCN é maior nas células tratadas com E2, seguida pelas células controle, e essas, por as células tratadas com MPA. Já após **48 h** de cultivo, as células controles expressam maior quantidade de DCN quando comparadas com as tratadas com MPA, porém a expressão de DCN nas células controles é menor que aquela observada em células tratadas com E2. Após **72 h** de cultivo observa-se uma diminuição na expressão de DCN por células tratadas com MPA. A expressão de DCN por células tratadas com E2, entretanto, é similar àquela dos controles (Figura 30).

Figura 30 - Expressão gênica de DCN estimada em relação à expressão de GAPDH por qPCR em células decíduais tratadas com E2 ou MPA por 24, 48 ou 72 horas

C: controle; E2: estrógeno; MPA: medroxiprogesterona. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

Como controle dos experimentos de qPCR foram construídas curvas de dissociação para as amostras de culturas de células decíduais utilizando-se os *primers* para biglicam, decorim e GAPDH. (Figura 31). As curvas de dissociação mostraram apenas um pico, confirmando que um único produto foi amplificado e que não houve a formação de dímeros que pudessem interferir na reação.

Figura 31 - Curvas de dissociação representativas das amostras de cultura de células. Biglicam (A) Decorim (B) e GAPDH (C).

Controle negativo (NTC).

4.4.2 Biomodulação da secreção do BGN e DCN por células decíduais antimesometriais de decíduoma tratadas com 17 β -Estradiol ou MPA.

A expressão do eixo protéico do BGN e DCN foi obtida pela análise de *Western blot* do meio condicionado das células decíduais tratadas com E2 ou MPA por 24, 48 e 72 h. Para essa análise as cadeias de GAGs foram isoladas do eixo protéico dos proteoglicanos, uma vez que os anticorpos produzidos para detecção de proteoglicanos reconhecem apenas o eixo proteico destas macromoléculas. A especificidade da clivagem dos GAGs pela enzima condroitinase ABC, foi testada por meio de um gel de agarose em tampão PDA (1,3 Diaminopropano Acetato), com a utilização de três padrões: (1) mistura de GAG condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparan sulfato; (2) padrão de dermatam sulfato; (3) padrão condroitim sulfato. Paralelamente, levou-se na corrida eletroforética, uma amostra dos padrões 2 e 3 digeridos pela enzima Condroitinase ABC (digestão a 30°C overnight), que tem substrato específico amplo, atuando em ambos os tipos de sulfato, o condroitim -4-sulfato e no dermatam sulfato. Como observado na figura 31 tanto a enzima Condroitinase ABC (0,2 U pH: 7.2) da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) quanto a condroitinase ABC (0,2 U pH 6,0) da empresa Seikagaku Kogyo (Tóquio, Japão) funcionaram adequadamente. Como observado na figura 32, nos poços onde correram as amostras tratadas por enzimas, a marcação foi abolida.

Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose de condroitim sulfato e dermatam sulfato submetidos à degradação com condroitinase ABC.

As amostras padrão de condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) incubadas com condroitinase ABC foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão PDA 0,005M pH9,0, corada com azul de toluidina. CS: condroitim sulfato; DS: dermatam sulfato; HS: heparam sulfato; 1: condroitinase ABC Sigma; 2: condroitinase ABC Seikagaku. M: mistura de padrões de GAG; HS: heparam sulfato.

As amostras de meio condicionado para *Western blot* foram preparadas e digeridas com condroitinase ABC a 30 °C em banho Maria, *overnight*. Paralelamente, outras amostras foram tratadas com a condroitinase ABC e beta eliminação. O anticorpo anti-BGN (LF-159) reconheceu duas banda nas amostras. Uma banda de ~ 70 kDa e outra de ~ 38 kDa. Do mesmo modo, o anticorpo anti-DCN (LF-113) também reconheceu duas bandas, uma de ~ 70 kDa e outra de ~ 40 kDa, como observado na figura 33. Diante desses resultados, contatamos diretamente o cientista que produziu os anticorpos (Dr. Larry Fisher, do *National Institute of Dental and Craniofacial Research*, NIH, USA), o qual sugeriu que considerássemos a banda de 40 kDa como o SLRP decorim e a de 38 kDa como o SLRP biglicam.

Figura 33 - Western blot representativo da avaliação da função das enzimas.

(A) Western blot para BGN; (B) Western blot para DCN.1: amostra sem digestão; 2: amostra digerida com Condroitinase ABC [pH:7.5] (Sigma); 3: amostra digerida com Condroitinase ABC [pH:6.5] (Saikagaku); 4: amostra Beta eliminação; a: banda inespecífica; b banda do core proteico.

Os meios condicionados após **24 h** de cultivo mostraram uma maior concentração do eixo proteico proteoglicano **BGN** nas culturas tratadas com E2, enquanto que as culturas sem hormônios e as com MPA apresentaram uma concentração semelhante entre elas, com uma leve tendência, não estatisticamente significativa, de ser menor para os meios obtidos de culturas tratadas com MPA. Quando as amostras tratadas com E2 foram comparadas com aquelas tratadas com MPA, obtivemos $p < 0,05$, enquanto a comparação de amostras E2 com as amostras controle apresenta $p < 0,01$. Após **48 h**, as culturas tratadas com MPA exibem um aumento nos níveis de expressão protéica quando comparado com as culturas tratadas as tratadas com E2 e as culturas controle ($p < 0,05$). Culturas de **72 h** mostram a mesma tendência observada nas culturas de 48 h. Ou seja, os níveis de expressão proteica de BGN são maiores nos meios condicionados das culturas tratadas com MPA, comparação com controles $p < 0,001$; comparação com E2 $p < 0,01$ (Figura 34).

Figura 34 - Western blot representativo da presença de biglicam (BGN) no meio condicionado de células decíduais tratadas por 24, 48 e 72 com estrógeno (E2) e medroxiprogesterona (MPA).

(A) Bandas representativas do *western blot* nos diferentes tempos de tratamento (24 h, 42 h e 72 h) e o tratamento (C: controle; E: estrógeno, P: medroxiprogesterona). **(B)** Níveis de BGN apresentados como média e desvio padrão de três amostras de três experimentos independentes. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

Os níveis de expressão do eixo protéico do DCN são elevados tanto nos meios condicionados das culturas controle quanto naqueles tratados com E2. Em culturas de **48 h**, a concentração de DCN é elevada tanto nas amostras tratadas como com E2 e as controles. Contudo, as amostras tratadas com E2 a expressão do eixo protéico do DCN tende a ser maior do que aquela observada nas culturas carente de hormônios. O tratamento com MPA promove uma diminuição significativa na expressão do eixo protéico quando comparada com os outros grupos $p < 0,05$. Em culturas de 72 h mantém um perfil de expressão similar ao de 48 h. Isso é mais elevada em culturas controle e tratadas com E2 do que naquelas tratadas com MPA. (Figura 35).

Figura 35 - Western blot representativo da presença de decorin (DCN) no meio condicionado de células decíduais tratadas por 24, 48 e 72 com hormônios estrógeno e medroxiprogesterona.

(A) Bandas representativas do *western blot* nos diferentes tempos de tratamento (indicados no lado da figura) e o tratamento (indicado no lado superior, C: controle; E: estrógeno, P: medroxiporegeterona). (B) Os níveis de DCN são apresentados como média e desvio padrão de três amostras de três experimentos independentes. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

4.4.3 *Imunolocalização dos SLPRs nas células decíduais antimesometriaies decíduoma tratadas com hormônios.*

A imunoreação para biglicam, tanto nas células controle quanto naquelas tratadas com E2 ou MPA, foi semelhante. Após **24 h** de tratamento a imunomarcção de biglicam foi observada na região perinuclear. Após **48 h**, a imunomarcção se espalhou pelo citoplasma da célula, desaparecendo inteiramente do citoplasma das células cultivadas por **72 h** (Figura 36). A hipótese é que a ausência de marcação para biglicam nas culturas de 72 h pode ter sido causada pela inabilidade deste proteoglicano de ser depositado sobre a superfície de vidro onde as células estavam aderidas. Sugerimos que as células decíduais necessitam da pré-existência de uma matriz para, só então, depositar o biglicam. (Figura 36).

Ao se observar as lâminas imunomarcadas, fica evidente que cultura de células tratadas com hormônios a imunomarcção é mais ampla. Para se avaliar este dado, foi quantificada a área total de cada célula imunomarcada. Esta análise corroborou a hipótese de que a distribuição da imunorreação é hormônio-

dependente. As células tratadas com hormônio apresentaram uma porcentagem maior de área imunomarcada quando comparadas com as células controles. A diferença estatística observada entre as células controles e as tratadas com E ou MPA por 24 e 48 horas foi de $p < 0,001$. Não houve diferença estatística na porcentagem de área marcada entre as células tratadas com E ou com MPA (Figura 37).

Figura 36 - Imunofluorescência para biglicam em células decíduais tratadas com E2 e MPA por 24 h, 48 h e 72 h e cultivadas em lamínulas de vidro.

Biglicam (verde), núcleo (azul). Após **24 h**, as células sem tratamento (controle) apresentaram marcação na região perinuclear, as células tratadas com E2 apresentaram uma marcação mais fraca rodeando o núcleo, enquanto as células tratadas com MPA apresentaram uma intensa marcação perinuclear, semelhante a grumos espalhados pelo citoplasma da célula. Após **48 h**, as células controle apresentaram uma imunomarkação espalhada pelo citoplasma, às células tratadas com E2 exibiram uma marcação densa na região perinuclear, enquanto as células tratadas com MPA exibiram marcação mais espalhada pelo citoplasma das células. Após **72 h** não foi observada marcação para biglicam em nenhuma das culturas, quer nos controles quer nas tratadas com hormônios.

Figura 37 - Porcentagem de área celular imunofluorescente para biglicam nas células decíduais cultivadas *in vitro* e tratadas com 10 µg/mL de E2 ou 5 mg/mL de MPA.

Após 24 h de cultivo, a porcentagem de área marcada, quando comparada com o controle, é maior para as culturas de células tratadas com MPA ($p < 0,001$); após 48 h; a porcentagem de área marcada é maior para as culturas tratadas com E2, porém não há diferença estatística entre as culturas tratadas com E2 e MPA. (* = $p < 0,05$), (** = $p < 0,01$), (***) = $p < 0,001$).

A imunolocalização para o proteoglicano DCN apresenta um padrão de distribuição diferente daquele observado para BGN. A distribuição da imunomarcacão foi semelhante tanto nas culturas controles quanto nas tratadas com os hormônios E2 ou MPA. Em todos os períodos analisados, DCN se distribuía por todo o citoplasma das células, desde a região perinuclear até a periferia da célula. Porém, observou-se que a intensidade e a amplitude da distribuição da imunomarcacão foram maiores nas culturas de células tratadas com E2, em todos os tempos estudados (Figura 38). A análise quantitativa da área total de imunomarcacão de cada célula mostrou que as culturas de células tratadas com E2 apresentavam uma área maior de imunomarcacão quando comparadas com as controles e com culturas tratadas com MPA. Em adição, as células controle apresentaram a maior porcentagem de área marcada quando comparadas com as células tratadas com MPA em 24 e 72 h ($p < 0,001$). Isso sugere que, enquanto E2 estimula a produção de DCN o MPA a inibe. Esse resultado sugere também, que a expressão desses proteoglicanos continua a ocorrer na ausência desses hormônios (Figura 39).

Figura 38 - Imunofluorescência para decorim nas células decíduais tratadas com E2 e MPA por 24 h, 48 h e 72 h.

Células cultivadas em lamínulas de vidro. Nas culturas de **24 h**, as células sem tratamento (controle) apresentaram uma fraca imunofluorescência na região perinuclear. Forte imunofluorescência perinuclear foi observada em células tratadas com E2, que foi mais intensa que nas células tratadas com MPA. Nas culturas de **48 h**, as células controle a imunofluorescência estava espalhada pelo citoplasma. As células tratadas com E2 exibiram uma imunorreação densa na região perinuclear, enquanto as células tratadas com MPA exibiram macacão mais espalhada pelo citoplasma. Nas culturas de **72 h**, as células controle exibiram uma imunomarcacão muito fraca espalhada pelo citoplasma enquanto aquelas tratadas com E2 apresentaram intensa marcação em todo o citoplasma das células. Contrariamente, nas células tratadas com MPA, a imunomarcacão é muito fraca e espalhada pelo citoplasma.

Figura 39 - Porcentagem de área celular imunomarcada para decorim nas células decíduais cultivadas *in vitro* e tratadas com 10 µg/mL de E2 ou 5 mg/mL de MPA.

Nas culturas de **24 h** a porcentagem de área marcada é maior nas células sem tratamento, sendo semelhante às tratadas com E2. As células tratadas com MPA apresentam uma porcentagem menor de área imunomarcada, quando comparada com E2 e com o controle. ($p < 0,001$). Nas culturas de **48 h**, as células controle e as tratadas com E2 ou MPA, apresentam porcentagem semelhante de imunomarcção. Nas culturas de **72 h**, as células tratadas com E2 exibem uma porcentagem de área marcada maior do que as células controle ($p < 0,05$) e aquelas tratadas com MPA ($p < 0,0001$), ($* = p < 0,05$), ($** = p < 0,01$), ($*** = p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

O útero é um órgão especial por várias razões, entre essas, pela sua única e excepcional capacidade de construir e desconstruir sua estrutura em um período de tempo excepcionalmente rápido. Esse processo pode ser bem observado durante a gestação e, após o parto, quando o endométrio, sofre intensa remodelação para receber e manter o embrião/feto, bem como para retornar a seu estado prévio (Aplin 2002; Carbone et al., 2006; San Martin et al., 2003a; Spiess et al., 2007).

Como já enfatizado na introdução dessa tese, várias publicações de nosso grupo mostraram, que em camundongos, a MEC endometrial é profundamente remodelada durante o processo de decidualização (Carbone et al., 2006; Greca et al., 1998; San Martin et al., 2003a,b; San Martin, Zorn, 2003; Spiess, Zorn, 2007; Spiess et al., 2007; Stumm, Zorn 2007).

Duas funções marcantes caracterizam a MEC: (i) suporte estrutural para os tecidos; (ii) interação, via integrinas e outros receptores, com a população de células residentes dos tecidos. No caso específico do útero, tais interações medeiam adesão celular, sobrevivência, migração, crescimento e diferenciação.

Estudos recentes de nosso laboratório obtidos durante o ciclo sexual e/ou em animais castrados submetidos à reposição hormonal, e de estudos realizados em decíduas obtidas de fêmeas grávidas mostraram, que a remodelação da MEC endometrial é modulada pelos hormônios E2 e MPA (Salgado et al., 2009a,b; Salgado et al., 2011). A questão remanescente desses estudos prévios, e que os estudos dessa tese pretendem esclarecer, é se sinais oriundos do embrião participam de algum modo, na deposição e remodelação da MEC durante a decidualização.

Para isso, nessa tese investigamos a organização de moléculas da MEC dos tecidos uterinos na ausência de embrião utilizando o modelo de deciduoma. As moléculas escolhidas para o estudo foram o colágeno tipo I, III, IV, e V e os proteoglicanos biglicam, decorim e versicam todas já estudadas por nosso laboratório na decídua de camundongos. Visando a dar maior fortaleza à proposta investigamos, também, a ação dos hormônios E2 e MPA sobre a síntese e secreção dessas mesmas moléculas da MEC em culturas primárias de células deciduais obtidas de deciduoma.

5.1 Distribuição de moléculas da MEC na decídua e no deciduoma

Nosso estudo mostrou que nos períodos estudados, a distribuição dos colágenos e dos proteoglicanos no deciduoma, apresenta um alto grau de semelhança com aquela encontrada na decídua.

5.1.1 Os Proteoglicanos

No deciduoma, a imunorreação para **decorim (DCN)** se apresentou como uma rede no estroma não decidualizado próximo ao miométrio, ao redor dos fibroblastos endometriais, glândulas e vasos. Estava também presente no tecido conjuntivo entre as camadas do miométrio. Distribuição semelhante foi observada na decídua por San Martin (2003a). Vimos ainda, que nas fases iniciais do desenvolvimento do deciduoma, o decorim foi suprimido da região de decídua madura como também observado na decídua por esses autores.

Estudos iniciais do nosso laboratório (Zorn et al., 1986) mostraram, que a perda de decorim na decídua está relacionada com surgimento de fibrilas espessas de colágeno na decídua madura (Zorn et al., 1986). Fibrilas espessas de colágeno também foram observadas no deciduoma por Andrade (1993). Além de estar relacionado com o controle da fibrilogênese, (Danielson et al., 1997) o decorim apresenta atividade antiproliferativa (Iozzo, Schaefer, 2010). A supressão de decorim na região de decídua madura a partir do dia 5 de gestação e também de pseudogestação, coincide com a onda de proliferação e de intensa síntese proteica, provocada pelo fenômeno de endoduplicação (poliploidia) que caracteriza os fibroblastos endometriais em processo de decidualização. Portanto, a ausência de DCN nesta região pode favorecer a intensa proliferação celular que ocorre no estroma endometrial em decidualização nesse período da gestação.

Os estudos *in vitro* mostraram que, tanto a expressão gênica quanto proteica de decorim, é suprimida ou diminuída nas culturas de células decidualizadas tratadas com MPA. Contrariamente, em culturas tratadas com E2 ou desprovidas de tratamento hormonal, a expressão de decorim aumenta. Corroborando os dados obtidos nos estudos da distribuição de decorim nos tecidos, esses dados obtidos *in vitro*, mostram a existência de evidente modulação hormonal na produção deste PGs. Salgado (2009a) mostrou que decorim está ausente no estroma superficial

durante o diestro, período dominado pela presença de progesterona (Wood et al., 2007). Além disso, resultados de Salgado et al. (2011) mostraram que camundongos ovariectomizados e tratados apenas com E2 foram capazes de recuperar a distribuição de decorim no estroma superficial do útero.

O SRLP **biglicam (BGN)** mostrou-se amplamente distribuído no estroma endometrial do deciduoma, em todos os dias estudados. A imunorreação para BGN estava presente no citoplasma das células deciduais maduras, nas células da pré-decídua e no estroma não decidualizado. Adicionalmente, observou-se que ao redor das células da região de decídua madura (RDM), o biglicam se apresentava em forma de fibrilas imunorreativas. Similar resultado foi observado na decídua de camundongos por San Martin et al. (2003a). Nossos estudos *in vitro* mostraram, que o tratamento com MPA aumentou os níveis de expressão de BGN após 48 e 72 h de tratamento e, portanto que, em ambas as estruturas, deciduoma e decídua, a deposição de BGN é modulada pelos níveis hormonais .

No presente estudo e nos anteriores já citados, o BGN foi imunolocalizado no citoplasma entre as células da região de decida madura. Essa molécula também foi localizada na região mesometrial do deciduoma, principalmente, no endotélio dos vasos sanguíneos. A imunorreação se intensificou gradativamente com o avanço da decidualização. O aumento na deposição de BGN coincide com a aparição das células natural Killer uterinas (NKu). As NKu são as células imunes mais abundantes presentes no endométrio durante a decidualização em camundongos (Ashkar, Croy, 2001; Croy et al. 2003). Estas células são progesterona-dependentes e tem um papel importante na fisiologia reprodutiva, participando na proteção imunológica inicial (Ashkar, Croy, 2001). Interessantemente, as células NKu estão presentes tanto no deciduoma quanto na decídua (Herington, Bany, 2007a; Herington, Bany, 2007b), indicando que o conceito não é de todo necessário para o surgimento e desenvolvimento destas células. Sabe-se que o biglicam atua também como um ligante potencial para a selectina L/CD44 o qual se acredita que atue no recrutamento de células natural killer CD 16(-) (Kitaya, Yasuo, 2009). Portanto, além de sua função como molécula estrutural da MEC, o biglicam poderia também atuar no recrutamento de NKu durante a decidualização tanto no deciduoma como na decídua.

Observamos que o **versicam (VER)**, membro da família de proteoglicanos de agregação, do mesmo modo que ocorre em fêmeas grávidas, é altamente

remodelado no útero de fêmeas pseudogravidas. O padrão de distribuição do VER é semelhante nas duas estruturas, decídua e deciduoma. A distribuição do VER no deciduoma diferem daquele observado por San Martin et al. (2003b) em estudos da decídua. Entretanto, os dados não podem ser comparados uma vez que esses dois estudos utilizaram anticorpos diferentes. No período do estudo realizado por San Martin et al. (2003b) ainda não era conhecida a existência de isoformas do versicam. Além disso, o anticorpo utilizado por San Martin reconhecia um peptídeo do VER humano. Portanto, não é possível saber com quais das isoformas do VER de camundongos este anticorpo reagia. Diante disso, não seria possível realizar comparação entre os dois estudos.

Para ultrapassar essa questão decidimos repetir os experimentos de San Martin et al., (2003b) em úteros de fêmeas grávidas do 5º ao 8º dia de gestação incubando as amostras com o mesmo anticorpo utilizado em nosso atual estudo em deciduoma. O anticorpo utilizado reconhece as isoformas V0 e V1, que apresentam o domínio β -GAG no seu eixo proteico (Wight, 2012). Utilizando o mesmo anticorpo, verificamos que a imunomarcagem para VER é idêntica em ambas as estruturas. Demonstramos também, que tanto na decídua como no deciduoma, as isoformas de versicam são igualmente sensíveis aos níveis hormonais. Nosso estudo contribuiu também para identificar, que as isoformas V0 e /ou V1 são aquelas presentes na região de estroma não decidualizado e pré-decídua, enquanto a imunomarcagem observada na decídua madura por San Martin et al., (2003b) poderiam corresponder às isoformas V2 ou V3. Entretanto, de acordo com Schmafeldt et al., (2000), a isoforma V2 seria exclusiva do tecido nervoso. Se essa afirmação de Schmafeldt et al., (2000) for verdadeira, a isoforma identificada nos estudos de San Martin et al., (2003b) na região de decídua madura é, provavelmente, a V3.

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram uma intensa modulação na expressão e distribuição de versicam no estroma uterino nas diferentes fases do ciclo estral. O estudo de Salgado et al. (2009) mostrou que durante a fase de diestro (caracterizada pelo predomínio de P4) ocorre uma diminuição na distribuição do VER (isoforma V0 e /ou V1) no útero. Quando os animais ovariectomizados são submetidos à reposição hormonal com E2 ocorre um aumento da expressão de VER nos tecidos uterinos.

5.1.2 Os Colágenos

No 5º dia pseudogestação colágeno tipo I foi imunolocalizado na região de decídua madura (RDM). Um estudo prévio realizado em decídua de camundongos por Spiess et al. (2007), mostrou entretanto, que o colágeno tipo I não era expresso nessa região nesse dia da gestação. Interessantemente, ambos os estudos Spiess et al. (2007) e o presente, mostraram que o colágeno tipo I é expresso intensamente no END. Nos dias 6º e 7º de pseudogestação a imunorreação deste colágeno foi intensa, mostrando-se como fibrilas espessas entre os espaços reduzidos da RDM, RPD e no END. Nos estudos em decídua realizados por Spiess et al. (2007) a imunorreação foi detectada no 6º dia de gestação apenas no END e, apenas uma fraca marcação foi identificada no 7º dia de gestação, em todas as regiões. No 8º dia de pseudogestação, a imunorreação para o colágeno do tipo I decresce em todas as regiões do deciduoma, resultado similar àquele obtido na decídua por Spiess et al. (2007). Embora no presente estudo tivéssemos obedecido ao mesmo protocolo utilizado por Spiess et al. (2007), as diferenças encontradas entre os dois estudos são muito tênues para que possamos, com segurança, atribuí-las à presença ou à ausência do embrião. A única observação, que talvez seja significativa, é a ausência na decídua madura, do colágeno tipo I e a sua substituição por colágeno tipo III como mostrado por Speiss et al. (2007). Os autores sugerem que, sendo o tipo I um colágeno que forma fibras espessas poderia dificultar a invasão do trofoblasto.

Observamos que do 5º ao dia 7º de pseudogestação o **colágeno tipo III** se apresenta como uma malha formada por fibras espessas distribuídas entre as células da RDM e RPD. No estroma não decidualizado (END) a expressão desse colágeno tornava-se mais intensa. No 8º dia de pseudogestação, apesar deste colágeno estar presente em todas as regiões do deciduoma, a imunofluorescência é mais fraca que nos dias anteriores. A distribuição deste colágeno na decídua (Spiess et al., 2007) é semelhante ao observado no deciduoma. Outra vez, a comparação de nossos resultados com aqueles obtidos em estudos de decídua indica que, do mesmo modo que colágeno tipo I, a deposição do colágeno tipo III independe da presença do embrião.

O **colágeno do tipo IV**, esteve presente ao longo do processo de decidualização durante todos os dias analisados. No 5º dia de pseudogestação, este colágeno se encontrava restrito nas membranas basais dos vasos sanguíneos,

epitélio glandular e luminal. No 6º e 7º dia apresentou-se como uma malha formada por fibras espessas presente, predominantemente, envolvendo as células da RDM e células da RPD. No 8º dia de pseudogestação a expressão deste colágeno foi fraca nas regiões de células RDM e RPD. Estes dados mostram que mesmo na ausência do trofoblasto, o colágeno tipo IV, componente característico de membrana basal, estrutura que deve ser degradada para permitir a invasão do trofoblasto, é produzida de modo idêntico na decídua e no deciduoma.

Wewer et al. (1986) mostrou que explantes de células do estroma endometrial, durante a decidualização (6º e 7º dia de gestação), continuam sintetizando um material perinuclear que contem componentes de membrana basal (laminina, entactina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanos do tipo heparam sulfato). Em adição, um trabalho recente fortemente suporta o fato que a presença de um estroma com componentes semelhante a uma lamina basal desempenha um importante papel na modulação da invasão do trofoblasto (Ramathal et al., 2011). Este conjunto de resultados indica um papel essencial das moléculas da MEC na preparação do endométrio para a implantação e o desenvolvimento do embrião. Curiosamente, como observado neste trabalho, o colágeno IV, um dos componentes-chave da lamina basal está presente na MEC do deciduoma, mesmo na ausência do trofoblasto.

O **colágeno tipo V**, no 5º dia de pseudogestação, foi pouco expresso em todas as regiões. O mesmo resultado foi encontrado na decídua por Spiess et al. (2007). Entretanto, a partir do 6º dia de pseudogestação (psg) os resultados divergem. Enquanto no deciduoma embora fraca, a imunomarcação foi vista nas RDM e RPD, na decídua, o colágeno V estava ausente (Spiess et al., 2007). No 7º dia de psg observou-se uma fraca marcação na região de células deciduais maduras, ausência de imunomarcação na região de células pré-deciduais e marcação mais intensa no estroma não decidualizado. Os estudos de Spiess et al. (2007) mostraram que intensa marcação em todas as regiões da decídua. No 8º dia, semelhante ao observado na decídua por Speiss et al. (2007) a imunorreação esteve ausente. As diferenças observadas na distribuição do colágeno V entre o presente estudo e o de Spiess e Zorn (2007) pode ser resultado do fato de que, na decídua ter sido identificado um tipo especial de colágeno tipo V homotrimérico. Como, no presente estudo não foram realizados estudos bioquímicos similares, não é possível afirmar se a mesma forma homotrimérica também ocorre no deciduoma.

Os resultados de um estudo recente (Herington et al., 2009) no qual foram utilizados diversos modelos de pseudogestação, sugerem que o crescimento decidual normal parece não requerer sinais parácrinos do conceito. Entretanto, a carência de estudos sobre a expressão de genes envolvidos na decidualização ainda permanece desafiando esse conceito.

Nosso estudo mostrou, que no geral, a expressão e distribuição das moléculas da MEC analisadas é similar na decídua e no deciduoma, particularmente, aquelas dos proteoglicanos decorim, biglicam, versicam e colágenos tipo III e IV, Já os colágenos tipo I e V apresentam algumas divergência, sendo, entretanto, o padrão de distribuição em modo geral muito semelhante ao observado na decídua. Portanto, esse conjunto de resultados indica claramente que a síntese, deposição e remodelação da MEC são eventos intrínsecos do processo de decidualização das células do endométrio. Este estudo mostra ainda que esses dois eventos são modulados pelo perfil hormonal, destes animais, e não por fatores oriundos do embrião. Isso consolida, o deciduoma como um modelo adequado para a obtenção de culturas primárias destinadas a estudos de síntese e secreção de moléculas da MEC e suas vias de sinalização.

5.2 Sínteses e secreção de moléculas da MEC por células de deciduoma cultivadas na presença e ausência de E2 e MPA

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a matriz extracelular é intensamente remodelada durante o ciclo estral (Salgado et al., 2009) indicando um controle hormonal sobre esse processo. Em adição, experimentos em camundongos ovariectomizados e submetidos a reposição hormonal, mostram que a deposição dos proteoglicanos decorim, biglicam, lumican e fibromodulina são modulados de modo específico, por níveis específicos de E2 e/ou MPA (Salgado et al., 2011). O efeito desses hormônios sobre a síntese e secreção de moléculas da MEC por células decidualizadas, entretanto, não era bem conhecido.

Em nossos experimentos as células deciduais obtidas de deciduoma mantiveram as mesmas características das células deciduais *in vivo* concordando com resultados prévios de nosso grupo (Amaral, 1998; Costa, 2002; Fontanele, 1999). O presente estudo mostrou que culturas primárias de células deciduais

mantém a capacidade de responder aos hormônios ovarianos E2 e MPA demonstrando, portanto, que esses, atuam como moduladores da expressão e da secreção de alguns proteoglicanos por estas células.

O primeiro estudos de células decíduais em cultivo foi desenvolvido por Kisalus et al. (1987), no qual foi demonstrado que culturas de explantes de decídua humana são capazes de sintetizar e secretar diversas moléculas da MEC como os colágenos do tipo I, III, IV, V e as glicoproteínas, laminina (LAM) e fibronectina (FNC). O mesmo grupo de autores mostrou que culturas de células decíduais humanas mantem a capacidade de sintetizar e secretar proteoglicanos do tipo heparam sulfato, (Kisalus et al., 1988).

Trabalhos recentes utilizando células decíduais humanas, de ratas e camundongos fêmeas confirmaram e expandiram os resultados de Kisalus, mostrando que as células decíduais em cultivo produzem proteoglicanos, inibidores de proteases e expressam integrinas (Alfonso et al., 1997; Babiarz et al., 1996; Costa, 2002). Entretanto, os fatores e os mecanismos que regulam a produção de componentes da MEC pelas células decíduais são ainda pouco conhecidos. O presente estudo mostra que os hormônios E2 e MPA regulam diferencialmente a produção de componentes específicos da MEC.

Os PGs DCN e BGN possuem cadeias de GAGs do tipo condroitim e dermatam sulfato. Neste estudo, observamos que E2 estimula uma maior expressão e secreção de DCN, enquanto que MPA estimula uma maior produção de BGN. Contudo, mesmo sem adição de hormônios, as culturas de decíduoma foram capazes de produzir estes proteoglicanos. Estudos de Jacob e Carson (1991), mostraram que culturas de células do estroma uterino, produzem GAGs do tipo condritim sulfato e acido hialurônico. Contrariamente, estudo de Wewer e Damgnov (1986) mostrou que o heparam sulfato constituía a maior proporção de componentes secretados por células do estroma uterino, seguido pelo condroitim sulfato. Em nosso estudo em cultura, não avaliamos a produção de proteoglicanos com cadeias de heparam sulfato. Entretanto, acreditamos que as diferenças entre estes dois trabalhos pode ser atribuída à forma de obtenção das células, pois as culturas de Wewer e Damgnov, realizados há mais de três décadas, poderiam estar contaminadas com células epiteliais, as quais são as principais produtoras de heparam sulfato.

Durante o período da decidualização os níveis hormonais de progesterona são maiores que os de estrógeno, pela existência dos corpos lúteos funcionais após a ovulação, os quais se manterão viáveis em caso de ocorrer à gestação. Contudo, previamente à decidualização, o estrógeno é importante para induzir a proliferação do epitélio uterino (Couse, Korach, 1999) e sensibilizá-lo para a ação da progesterona, dado que a expressão dos PRs é induzida pelo estrógeno (Graham, Clarke, 1997).

5.2.1 Efeito do estrógeno nas células decíduais

Observamos que o E2 promove um aumento na expressão e na secreção de DCN, quando comparado com as culturas tratadas com MPA. Por outro lado, nas culturas tratadas com E2, a expressão e secreção de BGN são menores do que aqueles observados nas culturas controle (sem tratamento hormonal). Essa observação nos sugere que E2 tem um efeito inibitório na expressão de este proteoglicano.

Uma exceção a este padrão foi observada nas culturas de células decíduais tratadas por 24 h com E2 as quais apresentaram uma maior secreção do eixo proteico de biglicam. Sabe-se que E2 tem a capacidade de regular a estabilidade do RNAm de varias moléculas, assim como a atividade das RNAases (Ing, 2005; Rao et al., 1994; Schauer, 1991) fato que poderia explicar a exceção observada. Um estudo recente de nosso grupo mostrou que E2 modula versicam a nível transcricional e pós-transcricional de um modo tempo dependente (Salgado et al., 2013). Estudos complementares seriam necessários para avaliar se o E2 também modula estabilidade do RNAm do BGN.

Como posto acima, nas células decíduas sem tratamento hormonal não houve abolição da expressão ou da secreção dos proteoglicanos estudados. Chama ainda a nossa atenção o fato de que em culturas sem tratamento hormonal, os níveis de DCN são semelhantes aquele observado em células tratadas com E2. Esse resultado é observado tanto em relação à secreção do eixo proteico como na deposição no meio extracelular vista por *wester blot* em culturas de 48 e 72 h assim como por imunohistoquímica em culturas de 24 h. A intensa modulação do DCN pelo E2, foi sugerida no estudo de Salgado et al. (2011) no qual mostram que nos úteros de animais ovariectomizados, sem reposição hormonal, a marcação para DCN, não

foi abolida, mantendo-se principalmente nas células do estroma profundo, e nos úteros dos animais tratados com E2 foi observada uma ampla e intensa deposição em todo o estroma. O estudo de Salgado também mostrou é que as diferentes células do estroma respondem de modo diferente ao hormônio. Isso é fato, pois a distribuição dos receptores para E2 e P4 é diferente.

Nosso estudo mostra que as células decíduais diminuem sua capacidade de sintetizar e secretar BGN, quando tratadas com E2. Por outro lado, os fibroblastos provenientes de pacientes com esclerose sistêmica, quando tratados com E2, aumentam a síntese de colágeno tipo I (Soldano et al., 2000), Zhou et al. (2002) também observaram que o E2 é capaz de incrementar a proliferação dos fibroblastos e diminuir a síntese de metaloproteinases que degradam os colágenos. Por tanto, estes estudos mostram que a ação do hormônio depende do tipo de célula, lembrando que as respostas das células por sua vez dependem da presença, ausência e/ou quantidade de receptores.

5.2.1 Efeito da MPA nas células decíduais

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide essencial para coordenar a fisiologia reprodutiva das fêmeas de mamíferos (Graham, Clarke 1997; Kim et al., 2013; Lee et al., 2006;).

Nossos resultados mostraram que a MPA é um importante modulador da expressão e secreção de biglicam para as células decíduais. Curiosamente, após 72 h de cultivo não foi observada imunorreação nas células cultivadas. Entretanto, a análise por *western blot* do meio condicionado, mostrou abundante quantidade de BGN. Nossa interpretação para esse resultado é que o longo período de cultivo (72h) sobre lâminas de vidro acelerou a velocidade de secreção que acabou ficando acumulada no meio condicionado.

Diferente do observado para BGN, o tratamento com MPA reduziu a expressão genica de DCN, assim como a expressão do seu eixo proteico e gerou menor distribuição da imunomarcagem para o PG decorim.

Este é o primeiro estudo que mostra a produção de proteoglicanos em cultivo de células decíduais, e que essa produção ocorre de modo diferencial, dependendo do tipo de hormônio presente no ambiente (E2 ou MPA). É importante ressaltar que, não se pode descartar que a concentração de hormônios mude o perfil de

modulação observada em nossos experimentos. Entretanto, em nosso estudo a concentração de hormônios na cultura foi padronizada e a escolha se deveu àquela concentração que mantinha a viabilidade das células.

A modulação de moléculas da MEC por hormônios ovarianos também ocorre em células não pertencentes ou sistema genital. Zhou et al. (2011) mostraram que os hormônios sexuais estradiol e progesterona inibem a expressão de MMP (metaloproteinases de matriz) e a atividade de IL-1 β , um inibidor da degradação do colágeno. Consequentemente, estes hormônios inibem a degradação do colágeno pelos fibroblastos na córnea. Sunil et al. (2000), também mostrou que na glândula mamaria de ratas, o estradiol e a progesterona tem um papel importante na modulação dos GAGs e na despolimerização das enzimas que participam na sínteses do mesmos. Em ratas submetidas a tratamento hormonal, viu-se que as tratadas com E2 apresentavam um incremento na concentração do ácido hialurônico na mama, enquanto as tratadas com P4 exibiam um aumento de condroitim sulfato. As ratas tratadas com E2 e P4 mostraram um aumento de condroitim sulfato, heparim sulfato e ácido hialurônico (Sunil et al., 2000). Esses resultados dão respaldo aos nossos que também mostram que a ação das moléculas da MEC em células decíduais varia de acordo com o hormônio.

Uma observação inédita do presente trabalho foi à demonstração de que, a proteína de filamento intermediário desmina, é modulada pelos hormônios E2 e MPA. Isso explica a desmina como um marcador de decidualização indicado por Glasser e Julian em 1986. Observamos que a área de marcação para esta molécula, é maior nas células tratadas pelos hormônios quando comparadas as células controles. Em adição, a marcação foi maior nas células tratadas pela MPA em relação às tratadas por E2. As alterações moduladas pelos hormônios esteroides no citoesqueleto tem sido demonstrado em outras células. Recentemente Hirahara e colaboradores (2013) mostraram que o E2 promove alterações rápidas na estrutura do citoesqueleto, caracterizadas pela perda de microtúbulos e filamentos de actina nos folhetos de membranas geradas pelos oligodendrócitos em cultura. Também foi observado, que fibroblastos endometriais humanos decidualizados *in vitro*, e tratados com hormônios ovarianos e AMPc, apresentam modificações no citoesqueleto, particularmente, a redução de α -actina de músculo liso e β -tubulina além de redistribuição da vinculina (Ihnatovych et al., 2007). Estudos de microarranjos de fibroblastos uterinos tratados com AMPc para induzir a

decidualização mostram uma notável reprogramação dos genes associados com a matriz extracelular e com a integridade dos tecidos, sugerindo que estas mudanças são uma característica proeminente da decidualização (Brar et al., 2001; Popovic et al., 2000; Tierney et al., 2003).

Em resumo, o presente, é o primeiro estudo realizado com células deciduais *in vitro* mostrando que os SLRPs decorim e biglicam sofrem modulação em sua expressão e secreção, e que esta modulação é tempo e hormônio dependente. Já havia indicações de que estes hormônios modulassem a expressão de moléculas da MEC, pois em úteros dos camundongos durante o ciclo estral as moléculas da MEC são profundamente remodeladas. Além disso, Salgado et al. (2009), já haviam observado que no útero de camundongos ovariectomizadas e submetidas a reposição hormonal (Salgado et al., 2011) esta modulação também acontecia. Este é, entretanto o primeiro estudo feito em decíduoma. Além de termos contribuído para dirimir a dúvida sobre a existência ou não de sinais parácrinos vindos do embrião, esse estudo consolida o decíduoma como fonte de células deciduais para cultivos primários destinados a estudar a ação dos hormônios ovarianos sobre a síntese e secreção de moléculas da MEC.

Além disso, o presente estudo reforça o conceito de que os hormônios ovarianos são moléculas-chaves no controle da remodelação da MEC endometrial, visto que os proteoglicanos analisados foram diferencialmente expressos e secretados quando as células deciduais foram tratadas com os hormônios. Adicionalmente, os resultados mostraram que os efeitos do E2 e MPA sobre dinâmica de síntese dos PGs são dependentes do tipo de hormônio, do tempo de tratamento e da molécula analisada. Portanto, podemos concluir que o embrião parece não ter um papel decisivo na deposição e remodelação das moléculas da matriz extracelular investigadas nessa tese.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo permite concluir que:

1. A composição da matriz extracelular do decíduoma é semelhante àquela da decídua.
2. A intensa remodelação dos componentes da matriz extracelular é um evento intrínseco do processo de decidualização que se observa tanto na decídua como no decíduoma.
3. As afirmações anteriores dão suporte ao uso do decíduoma como um modelo adequado para a obtenção de culturas primárias destinadas a estudos de síntese e secreção de moléculas da MEC e suas vias de sinalização.
4. Os hormônios ovarianos são fatores-chave do controle da deposição e remodelação da MEC durante a decidualização tanto *in vivo* como em cultivo primário de células obtidas de decíduoma.
5. Os hormônios E2 e MPA regulam a expressão genica e proteica dos proteoglicanos decorim e biglicam nas células deciduais *in vitro* de modo diferencial.
6. Os hormônios E2 e MPA controlam a expressão da proteína desmina um marcador da decidualização.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool.* 1993;266(6):603-28.
- Abrahamsohn PA, Zorn TMT, Oliveira SF. Decidua in rodents. In: Glasser SR, Aplin JD, Guidice LC, Tabibzadeh S, editors. *The endometrium*. London: Informa Healthcare; 2002. p. 279-93.
- Alberto-Rincon MC, Zorn TM, Abrahamsohn PA. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Am J Anat.* 1989; 186(4):417-29.
- Alberts B, Alexander J, Lewis J, Martin R, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2007. p. 1164- 91.
- Afonso S, Romagnano L, Babiarz B. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development.* 1997;124(17):3415-25.
- Amaral HV. *Estabelecimento de Culturas. Primárias de células deciduais de camundongo*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1998.
- Andrade CG. *Decidualização Induzida em Camundongas Pseudográvidas - Estudo Morfológico e Ultra-estrutural*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1993.
- Aplin JD. Endometrial Extracellular Matrix. In: Glasser SR, Aplin JD, Guidice LC, Tabibzadeh S, editors. *The endometrium*. London: Informa Healthcare; 2002. p. 294-307.
- Ashkar A, Croy A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol.* 2001;13(4):235-41.
- Babiarz B, Romagnano L, Afonso S, Kurilla G. Localization and expression of fibronectin during mouse decidualization in vitro: mechanisms of cell: matrix interactions *Dev Dyn.* 1996;206(3):330-42.
- Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young, M. Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem.* 2009;284(36):24035-48.
- Brar AK, Handwerger S, Kessler CA, Aronow BJ. 2001. Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics* 7:135–148
- Bel SC, Searle RF. Differentiation of decidual cells in mouse endometrial cell cultures. *J Reprod Fertil.* 1981;61(2):425-33

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):565-73.

Bijovsky AT, Zorn TM, Abrahamsohn PA. Remodeling of the mouse endometrial stroma during the preimplantation period. *Acta Anat (Basel).* 1992;144(3):231-34.

Calabrese GC, Gazzaniga S, Oberkersch R, Wainstok R(2011). Decorin and biglycan expression: its relation with endothelial heterogeneity. *Histol Histopathol.* 2011;26(4): 481-90.

Carbone K, Pinto NM, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Arrangement and fine structure of collagen fibrils in the decidualized mouse endometrium. *Microsc Res Tech.* 2006;69(1):36-45.

Cataruzza S, Schiappacassi M, Ljungberg-Rose A, Spessotto P, Perissinotto D, Morgelin M, Mucignant MT, Colombatti A. and Perris R. Distribution of PG-M/ Versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration and neoangiogenesis in vitro. *J. Biol. Chem.* 2002;277, 47626-35.

Cha J, Sun X, Dey S K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine.* 2012;18(12): 1754-67.

Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57(1), 339-55.

Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 1993; 4(6): 483-93.

Costa FG. Influencia de componentes da matriz extracelular em cultivos primários de células decíduais antimesometriais de camundongos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Couse JF, Lindzey J, Grandien KA J, Gustafsson J Å, Korach KS.. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology.* 1997;138(11):4613-21.

Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocrine reviews.* 1999;20(3): 358-417.

Couse JF, Hewitt SC, Korach KS. Steroid Receptor in the Ovary and Uterus. In Jimmy D. Neill, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* 3th ed. Elsevier; 2006. p. 593-658.

Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction.* 2003;126(2):149-60.

Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*. 1994;120 (12):3657-66.

Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*. 1997;136(3):729-43.

Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol*. 1995;9(6): 691-705.

Das A, Mantena SR, Kannan A, Evans DB, Bagchi MK, Bagchi IC. De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(30):12542-47.

Das A, Li Q, Laws MJ, Kaya H, Bagchi MK, Bagchi IC. Estrogen-induced expression of Fos-related antigen 1 (FRA-1) regulates uterine stromal differentiation and remodeling. *J Biol Chem*. 2012; 287(23):19622-630.

Dey SK, Lim H, Das SK., Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews*. 2004; 25(3):341-73.

Enders AC, Schlafke S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat*. 1967;120(2):185-225.

Enders AC, Schlafke S. Implantation in nonhuman primates and in the human. *Comp Primate Biol*. 1986;3: 291-310.

Edwards IJ. Proteoglycans in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*. 2012;9(4):196-206.

Favaro R, Abrahamsohn P, Zorn T. Decidualization and Endometrial Extracellular Matrix Remodeling. In: Croy A, Yamada AT, DeMayo F, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Elsevier (no prelo).

Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil*. 1974; 39(1):195-206.

Fontanele JD. Células Deciduais de Camundongos Fêmeas Pseudogravidas em Cultivo Primário: Análise Ultra-Estrutural e Caracterização Imunocitoquímica. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.

Glasser SR, Julian J. Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod*. 1986;35(2):463-74.

Glasser SR, Lampelo S, Munir MI, Julian J. Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Differentiation*. 1987; 35(2):132-42.

Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews*. 1997;18(4):502-19.

Greca CP, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes. *Tissue Cell*. 1998;30(3):304-11.

Greca CD, Nader HB, Dietrich CP, Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglycans in the endometrium of mice. *Anat Rec*. 2000;259(4):413-23.

Gu Y, Gibori G. Rat decidual cell cultures. In: Soares MJ, Hunt JS, editors. *Placenta and trophoblast: methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2006. Vol. 1. p. 69-76.

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-9.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*. 2007;87(3):905-31.

Herington JL, BanyBM. Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization. *Biol Reprod*. 2007a;76(4):579-88.

Herington JL, Bany BM. The conceptus increases secreted phosphoprotein 1 gene expression in the mouse uterus during the progression of decidualization mainly due to its effects on uterine natural killer cells. *Reprod*. 2007b;133(6):1213-21.

Herington JL, Underwood T, McConaha M, Bany BM. Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. *Endocrinology*. 2009;150(9): 4404-13.

Hirahara Y, Matsuda KI, Liu YF, Yamada H, Kawata M, Boggs JM. 17 β -Estradiol and 17 α -estradiol induce rapid changes in cytoskeletal organization in cultured oligodendrocytes. *Neuroscience*. 2013, 3;235:187-99

Iacob D, Cai J, Tsonis M, Babwah A, Chakraborty C, Bhattacharjee RN, Lala PK. Decorin-mediated inhibition of proliferation and migration of the human trophoblast via different tyrosine kinase receptors. *Endocrinology*. 2008;149(12),6187-97.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998;67(1):609-52.

Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*. 1999; 274(27):18843-46.

Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J.* 2010;277(19):3864-75.

Ing NH. Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod.* 2005;72(6):1290-96.

Ihnatovych I, Hu W, Martin JL, Fazleabas AT, de Lanerolle, Strakova Z. Increased phosphorylation of myosin light chain prevents in vitro decidualization. *Endocrinology.* 2007;148(7):3176-84.

Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 1991;71(2):481-539.

Jacobs AL., Carson DD. Proteoglycan synthesis and metabolism by mouse uterine stroma cultured in vitro. *J Biol Chem.* 1991;266(23):15464-73.

Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR. (2000). Expression of estrogen receptor β is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod.* 2000;62(2): 310-17.

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

Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev.* 2013;34(1):130-62.

Kisalus LL, Herr JC, Little CD. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first-trimester human decidua. *Anat Rec.* 1987;218(4):402-15.

Kisalus LL, Herr JC. Immunocytochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in human decidual cell secretory bodies and placental fibrinoid. *Biol Reprod.* 1988;39(2):419-30.

Kitaya K, Yasuo T. Dermatan sulfate proteoglycan biglycan as a potential selectin L/CD44 ligand involved in selective recruitment of peripheral blood CD16 (–) natural killer cells into human endometrium. *J Leukoc Biol.* 2009;85(3):391-400.

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60(1):443-75.

Kleinfeld RG, O'Shea JD. Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol Reprod.* 1983;28(3):691-702.

Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology.* 1993;132(6):2371-9.

Kurita T, Lee K J, Saunders PT, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod*. 2001;64(1):272-83.

Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soegiarto DW, DeMayo FJ. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet*. 2006;38(10):1204-09.

Lejeune B, Van Hoesck J, Leroy F. Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *J Reprod Fertil*. 1981;61(1):235-40.

Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science*. 2011;331(6019):912-16.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. W. H Freeman and Company; 2000. p. 209-23.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive qqwsesee

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

Martello EM, Abrahamssohn PA. Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. *Acta Anat (Basel)*. 1986;127(2):146-50.

McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans *J Struct Biol*. 2006;155(2): 294-305.

Mochizuki Y, Shinomura T, Kimata K; 1998. Disponível em: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGA04E.html>

Monice FL. Involução do decíduoma induzido em camundongos pseudogravídios : estudo estrutural, ultra-estrutural e imunocitoquímico. São Paulo: Universidade de São Paulo;1998.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 1998;273(1):200-6.

Muro MD. Localização imunocitoquímica da laminina e fibronectina na decídua e no decíduoma de camundongos fêmeas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2000.

Nilsson B, De Luca S, Lohmander S, Hascall VC Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the Swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem*. 1982;257(18):10920-27.

Oliveira SF, Greca CP, Abrahamsohn PA, Reis MG, Zorn TM. Organization of desmin-containing intermediate filaments during differentiation of mouse decidual cells. *Histochem Cell Biol*. 2000;113(4):319-27.

Oliveira SF, Nagata T, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Incorporation of 3H-proline by mouse decidual cells: an ultrastructural radioautographic study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86 Suppl 3:101-2.

Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. 2000. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 141:3510–3513

Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod*. 1987;36(1):211-25.

Paria BC, Tan J, Lubahn DB, Dey SK, Das SK. Uterine decidual response occurs in estrogen receptor- α -deficient mice. *Endocrinology*. 1999; 140(6):2704-10.

Pratt WB, Toft DO. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews*. 1997,18(3):306-60.

Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm*. 1973.31(2):11-256.

Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*. 2010;28(1):17-26.

Ramathal C, Wang W, Hunt E, Bagchi IC, Bagchi MK. Transcription Factor CCAAT Enhancer-binding Protein β (C/EBP β) Regulates the Formation of a Unique Extracellular Matrix That Controls Uterine Stromal Differentiation and Embryo Implantation. *J Biol Chem*. 2011; 286(22):19860-71.

Rao KS, Sirdeshmukh R, Gupta PD. Modulation of cytosolic RNase activity by endogenous RNase inhibitor in rat vaginal epithelial cells on estradiol administration. *FEBS letters*. 1994;343(1):11-14.

REST© Beta. Version 1.9.12. Hilden: Qiagen, 2009. Software. Disponível em: <<http://www.REST.de.com>>. Acesso em: Junho 2013.

Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med*. 1998;4(3):303-8.

Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991;64(5):867-9.

Salgado RM, Favaro RR, Martin SS, Zorn TM. The estrous cycle modulates small leucine-rich proteoglycans expression in mouse uterine tissues. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009a;292(1):138-53.

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

Salgado RM, Favaro RR, Zorn TM. Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;4(9):22.

Salgado RM, Covarrubias AC, Favaro RR, Serrano-Nascimento C, Nunes MT, Zorn TM. Estradiol induces transcriptional and posttranscriptional modifications in versican expression in the mouse uterus. *J Mol Histol*. 2013;1-9.

Sananes N, Weiller S, Baulieu EE, Le Goascogne CL. In vitro decidualization of rat endometrial cells. *Endocrinology*. 1978;103(1):86-95.

San Martin S, Soto-Suazo M, De Oliveira SF, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TM. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. 2003a;125(4):585-95.

San Martin S, Soto-Suazo M, Zorn TM. Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization. *Braz J Med Biol Res*. 2003b;36(8):1067-71.

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

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

Sanches JC, Jones CJ, Aplin JD, Iozzo RV, Zorn TM, Oliveira SF. Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J Anat*. 2010;216(1):144-55.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova, Gröne HJ. 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, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21305-9.

Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):237-46.

Schauer RC. Effects of estradiol and progesterone on rat uterine ribonuclease inhibitor activity. *Horm Metab Res*. 1991;23(04):162-5.

Schlafke S, Enders AC. Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J Anat*. 1967;102(1):13-32.

Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR. Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 5):807-16.

Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J.* 1988;252(2):313-23.

Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, Iozzo RV. Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2006;281(36): 26408-18.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.

Soldano S, Montagna P, Brizzolara R, Sulli A, Parodi A, Serio B, Paolino S, Villaggio B, Cutolo M. Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1193:25-9.

Spiess K, Teodoro WR, Zorn TM. Distribution of collagen types I, III, and V in pregnant mouse endometrium. *Connect Tissue Res.* 2007;48(2):99-108.

Spiess K., Zorn, T. M. T. Collagen types I, III, and V constitute the thick collagen fibrils of the mouse decidua. *Microscopy research and technique.* 2007;70(1): 18-25.

Stumm CL, Zorn TM. Changes in fibrillin-1 in the endometrium during the early stages of pregnancy in mice. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(4):258-68.

Sunil, N, Srinivasan N, Aruldas MM, Govindarajulu P. Impact of oestradiol and progesterone on the glycosaminoglycans and their depolymerizing enzymes of the rat mammary gland. *Acta Physiol Scand.* 2000;168(3):385-92.

Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development.* 1993;119 (4):1175-86.

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.

Teodoro WR, Witzel SS, Velosa AP, Shimokomaki M, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Increase of interstitial collagen in the mouse endometrium during decidualization. *Connect Tissue Res.* 2003;44(2):96-103.

Tibbetts 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(5):1143-52.

Tierney EP, Tulac S, Huang ST, Giudice LC. 2003. Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation. *Physiol Genom* 16:47–66

Tong W, Pollard J W. Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E-and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):2251-64.

Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*. 2004;117(1):53-62.

Welsh AO, Enders AC. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat Rec*. 1887;217(2):203-19.

Wewer UM, Damjanov A, Weiss J, Liotta LA, Damjanov I. Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. *Differentiation*. 1986;32(1):49-58.

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.

White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN- γ promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN- γ gene expression between human neonatal and adult CD45RO⁺ T cells. *J Immunol*. 2002;168(6):2820-7.

Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):617-23.

Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 2007;133(5):1035-44.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*. 1990;346(6281):281-4.

Yamaguchi Y, Ruoslahti E. Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature*. 1988;336(6196):244-6.

Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*. 2013.

Zhou H, Kimura K, Orita T, Nishida T, Sonoda KH. Inhibition by female sex hormones of collagen degradation by corneal fibroblasts *Mol Vis*. 2011;17:3415-22.

Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(4):635-53.

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

Zorn TM, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. Cell Tissue Res. 1986;244(2):443-8.

Zorn TM. Células decíduais. In: Carvalho H e Collares-Buzato C, editores. Células: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo; Manole Ltda. 2005. p. 346-55.

ANEXO A

ANEXO A - Colágenos nos vertebrados

Tipo	Classe	Composição	Distribuição ^(*)	Patologia
I	Fibrilar	$\alpha 1[I]_2\alpha 2[I]$	Abundante amplamente distribuído: dermis, osso, tendão, ligamento.	Síndrome Ehlers-Danlos; osteoporoses
II	Fibrilar	$\alpha 1[II]_3$	Cartilagem, vítreo	Osteoartroses, condrodisplasia
III	Fibrilar	$\alpha 1[III]_3$	Pele, sangue, vasos, intestino.	Síndrome de Ehlers-Danlos, aneurisma arterial.
IV	Rede	$\alpha 1[IV]_2\alpha 2[IV]\alpha 3[IV]\alpha 4[IV]\alpha 5[IV]\alpha 5[IV]_2\alpha 6[IV]$	Membrana basal	Síndrome Alport
V	Fibrilar	$\alpha 1[V]_3$ $\alpha 1[V]_2\alpha 2[V]$ $\alpha 1[V]\alpha 2[V]\alpha 3[V]$	Amplamente distribuído: osso, cartilagem, córnea, placenta.	Síndrome Ehlers-Danlos
VI	Rede	$\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]\alpha 3[VI]$ $\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]\alpha 4[VI]$	Amplamente distribuído: osso, cartilagem, córnea, dermis.	Miopatia de Bethlem
VII	Fibras de ancoragem	$\alpha 1[VII]_2\alpha 2[VII]$	Dermis, bexiga	Epidermólise bolhosa adquirida
VIII	Rede	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$	Amplamente distribuído: dermis, cérebro, coração, rim.	Endotélio Fuchs distrofia corneal.
IX	FACIT ^(**)	$\alpha 1[VIII]_2\alpha 2[VIII]$	Cartilagem, córnea, vítrea.	Osteoartroses, displasia epifisária múltipla.
X	REDE	$A1[X]_3$	Cartilagem	Condrodisplasia
XI	Fibrilar	$\alpha 1[XI]\alpha 2[XI]\alpha 3[XI]$	Cartilagem disco intervertebral.	Condrodisplasia, osteotroses.
XII	FACIT	$\alpha 1[XII]_3$	Dermis, tendão.	-
XIII	MACIT	-	Células endoteliais, dermis, olho, coração.	-
XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]_3$	Amplamente distribuído: osso, dermis, cartilagem.	-
XV	MULTIPLEXIN	-	Capilares, testículo, rim, coração.	-
XVI	FACIT	-	Dermis, rim.	-
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]_3$	Hemidesmosomos no epitélio.	Epidermólise Bolhosa atrofica generalizada.
XVIII	MULTIPLEXIN	-	Membrana basal, fígado.	Síndrome de Knobloch
XIX	FACIT	-	Membrana Basal.	-
XX	FACIT	-	Córnea (pintinho)	-
XXI	FACIT	-	Estômago rim.	-
XXII	FACIT	-	Junções de tecidos	-
XXIII	MACIT	-	Coração, retina.	-
XXIV	Fibrilar	-	Ossos, córnea	-
XXV	MACIT	-	Cérebro, coração, testículo.	Formação de amiloide?
XXVI	FACIT	-	Testículo e ovário.	-
XXVII	Fibrilar	-	Cartilagem.	-
XXVIII	-	-	Dermis, nervo ciático.	Doença neurodegenerativa?

(*) : Lista parcial dos tecidos em que o tipo relevante de colágeno se localiza.

(**) Abreviações: FACIT, colágeno associado a fibrilas com tríplex hélice interrompida do inglês: *fibril-associated collagen with interrupted triple helices*; MACIT, colágeno associado a membrana com tríplex hélice interrompida do inglês: *membrane-associated collagen with interrupted triple helices*; MULTIPLEXIN, domínios de tríplex hélice múltipla e interrupções do inglês *multiple triple helix domains and interruptions*.

Fonte: Shoulders e Raines, 2010

ANEXO B - Classificação dos proteoglicanos da matriz intersticial

Localização	Classificação	Nome	Proteína (~kDa)	GAGs	Células e tecidos
T R I N I T A R I A N O I N T E R S T I C I A L	SLRPs(Small leucine rich Protein) – Baixo peso molecular	Decorin	40	CS/DS	Tecido conjuntivo
		Biglicam	40	CS	Tecido conjuntivo
				DS	
		Fibromodulim	42	KS	Tecido conjuntivo
		Lumicam	38	KS	Córnea
		Queratam	38	KS	Córnea e tecido conjuntivo
		PRELP	44	KS	Cartilagem articular e fibroblasto
		Osteoaderim	42	KS	Tecido ósseo
		Epificam	35	CS/DS	Tecido ósseo
	Hialectans – Alto peso molecular	ecam	35	KS	Tecido ósseo e
		(osteoglicim)			Córnea
		Agrecam	220-250	CS/KS	Cartilagem
		Versicam	265-370	CS/DS	Fibroblasto
		Neurocam	136	CS	Cérebro de rato
		Brevicam	100	CS	Cérebro de bovino
	Outros PGs	Apicam	100-110	CS	Astrócitos
		Colágeno tipo (α2)		CS	Cartilagem e humor vítreo