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: Profª. Drª. Telma M.T. Zorn

Co-Orientadora: Profª Drª. 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

RESUMO

Covarrubias CA. Análise da ação do embrião e dos hormônios ovarianos na regulação da matriz extracelular de células deciduais: 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 varias 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 evidencias, 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 deciduais. 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 medroxiprogesterone (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.

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 serie 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 inicio 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 estoma. Durante a gestação em roedores, o contato do blastocisto como 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 serie 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-alogênico 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 concepto. 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 deciduais sofrem endoduplicação, um processo pelo qual as células passam por ciclos de replicação do DNA sem, entretanto, realizarem a citocinese. A endorreduplicação 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 morfologicamente semelhantes àqueles dos outros tecidos conjuntivos, diferem daqueles, por possuírem a capacidade de se transdiferenciar em células deciduais, quando devidamente estimulados pelos hormônios ovarianos E2 e P4.

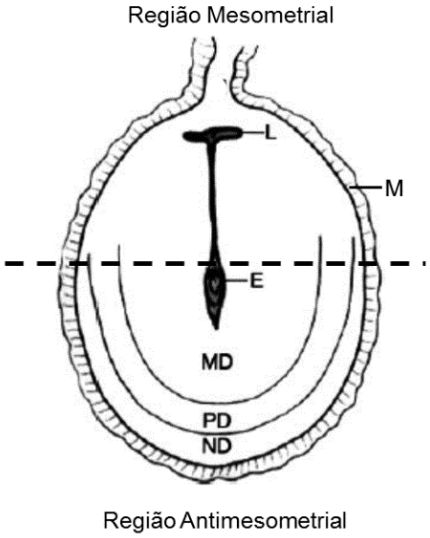
As células deciduais maduras são volumosas, poliédricas, polinucleadas e justapostas, possuindo características tipicamente epitelióides.

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-deciduais, constituída por células que apresentam características intermediárias entre as células deciduais maduras e os fibroblastos endometriais. A última região da decídua situa-se nas imediações do miométrio, e é constituída por células que permanecem morfologicamente 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 a 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.

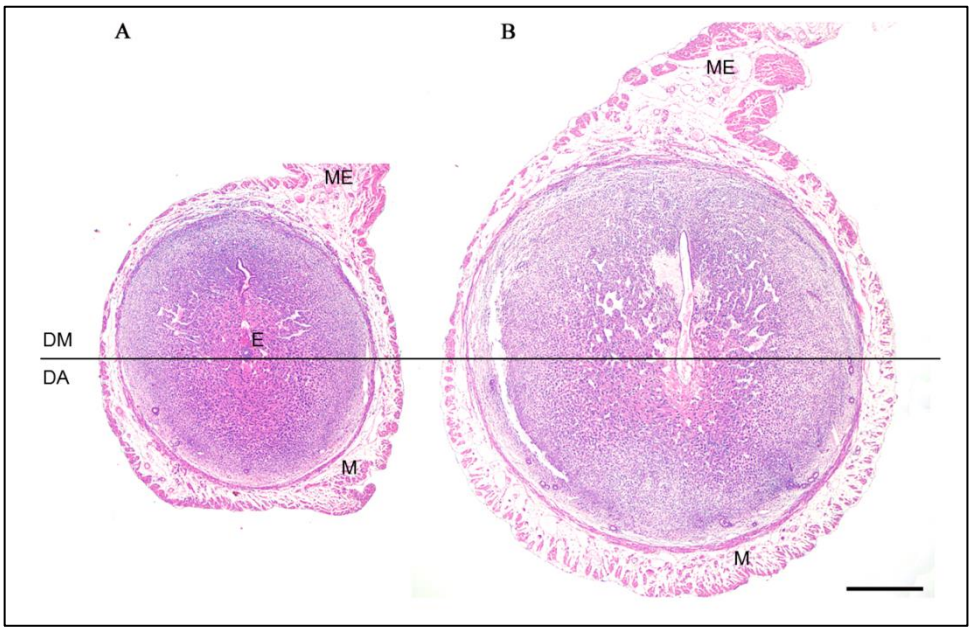


O embrião (E) localiza-se na região antimesometrial da cripta de implantação. A região antimesometrial mostra três regiões: região de células deciduais maduras (MD), região de células pré-deciduais (PD), e uma região de estroma não decidualizado (ND) localizada na interface com o miométrio (M), luz uterina (L). A linha ponteada separa a região mesometrial da antimesometrial.
Fonte: Adaptado de: Spiess e Zorn (2007).

1.1.3 Decidualização Induzida

Em humanos, sob a influencia 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 deciduoma (Loeb, 1908) (Figura 2). O tecido decidual de ambos, decídua e deciduoma, apresenta características morfológicas e funcionais similares. Portanto, o deciduoma representa um modelo valioso para se analisar a decidualização sem a influência do embrião. Da mesma forma, por não conter células embrionárias, o deciduoma 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 deciduoma 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 epitelióide acompanhado por redução dos espaços intercelulares, promovendo, consequentemente, 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 7ºdia 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).

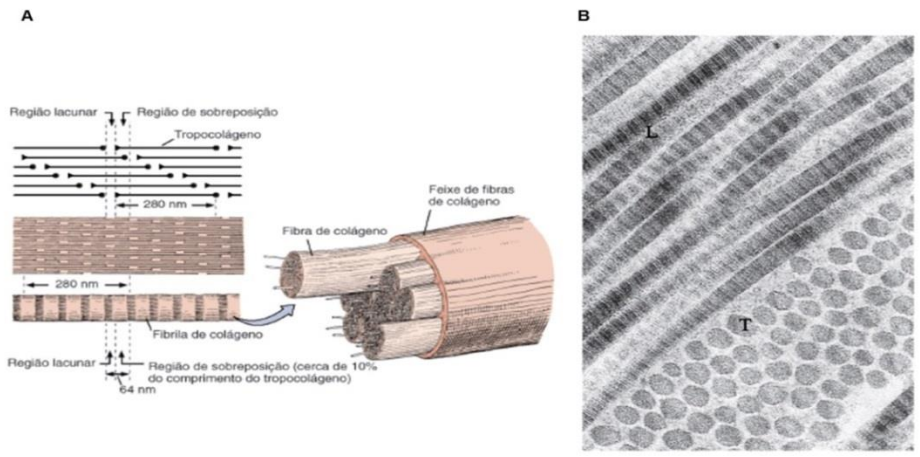
Os principais componentes da MEC são: i) colágenos; ii) componentes do sistema elástico; iii) glicosaminoglicanos; iv) proteoglicanos e v) glicoproteínas adesivas.

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 dobram 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).

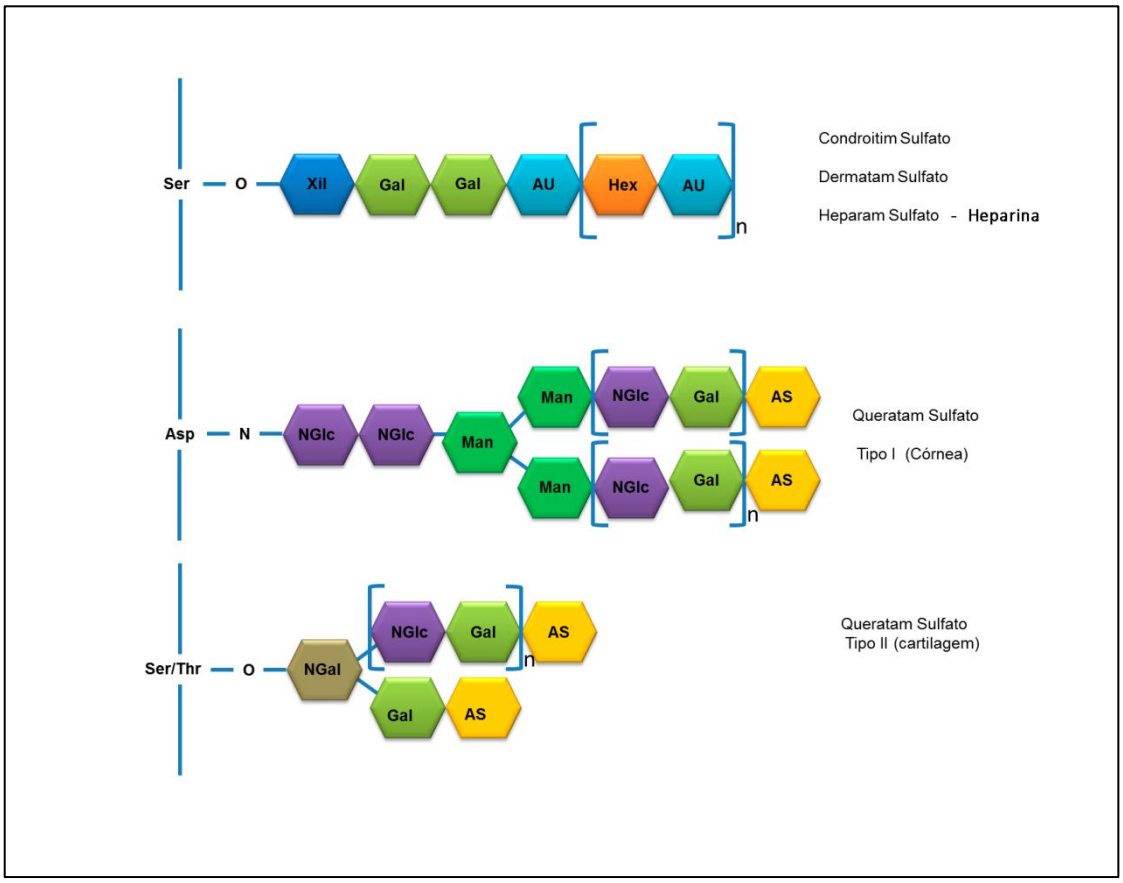
A formação das fibrilas de colágeno ou fibrilogênese é um processo complexo que envolve a associação de tipos diferentes de colágeno e o processamento enzimático, sendo que alterações nestes fatores podem comprometê-la. Neste processo destaca-se também a participação de outro grupo de moléculas da família 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; Kjeuin, Lindahl, 1991). Os GAGs resultantes são: condrointim 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.



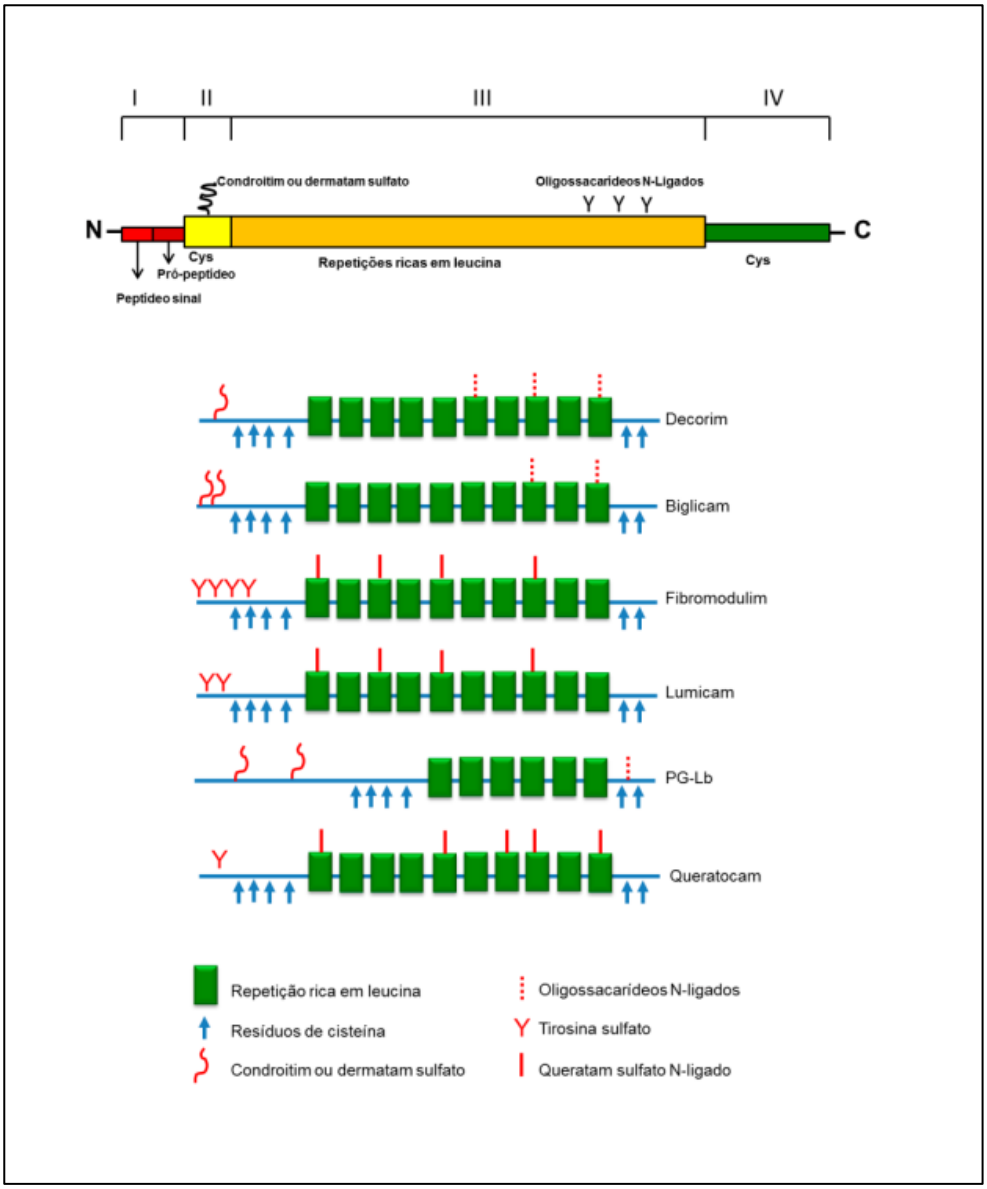
Xil: xilose; Gal: galactose; AU: acido urônico; Hex: hexosamina; NGal: N-acetilgalactosamina; NGlc: N-acetilglucosamina; AS: acido siálico; Man: manose; Ser: serina; Asp: asparagina; Thr: treonina; Fuc: fucose
Fonte: Adaptado Iozzo, 2002

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 osteoaderim, 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 opticim, que apresenta sequência rica em cisteina 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 $CX_3CXCX_{6\text{-}17}C$, 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 $CX_{3\text{-}4}CXCX_9C$ (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 extravilloso, 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).

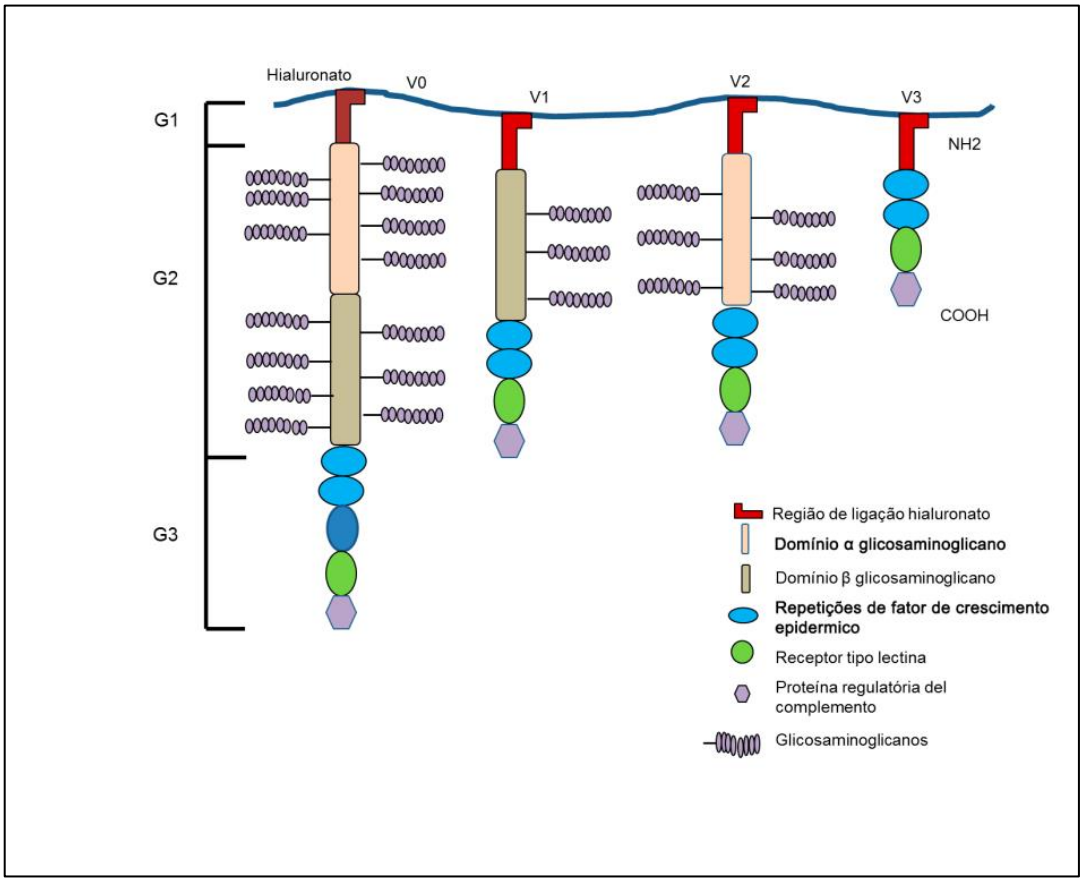
1.2. 2.2 Proteoglicanos de alto peso molecular - Hialectanos

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 controitim 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 β1, participando de processos como proliferação e diferenciação celular (Wight, 2002; Yao et al., 2005).

Figura 6 - Representação esquemática de vesicam 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 àcida-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, analises realizadas pela histoquímica do picrosirius (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 deciduais 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 deciduais (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 deciduais. Demostrou-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), perlecam e sindecam-4 (San Martin et al., 2004) são expressos pela decídua. Abundante depósito de versicam foi imunolocalizado na região de células deciduais maduras e na região de células pré-deciduais 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

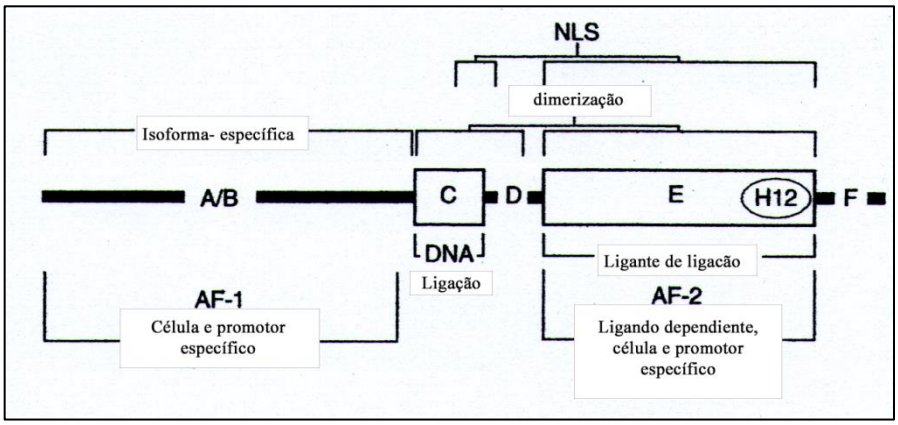
Os receptores de hormônios esteroides são essenciais na fisiologia humana e de roedores, conforme exemplificado pelas consequências dramáticas da perda do receptor, observadas em animais nocautes. Os hormônios esteroides estão integrados em cada aspecto da fisiologia reprodutiva dos mamíferos, em ambos 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 especifico 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 sequencia 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 una 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 esta ancorado na região A/B e exibe uma atividade constitutiva *in vitro,* ao passo que o domínio AF-2 esta 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 sequencia primaria, 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 esta dado 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 sequencias de nucleotídeos características dos sítios de DNA, chamados *elementos resposta,* que ligam vários receptores. As sequencias 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).

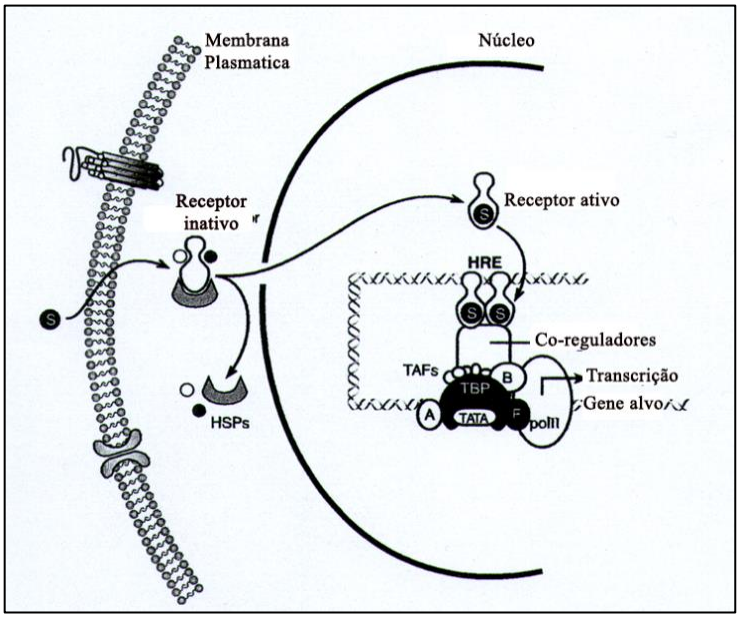
(iv) LBD o domínio E: é uma região multifuncional altamente estruturada que serve principalmente para ligar especificamente o ligante e permitir a atividade transcricional dependente do ligante. Este domínio de ligação de hormônio situa-se próximo à extremidade C-terminal desses receptores e contém um 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) Dominio F: Só os ERs possuem um domínio F bem definido. Embora alguns dados indiquem que o domímio 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

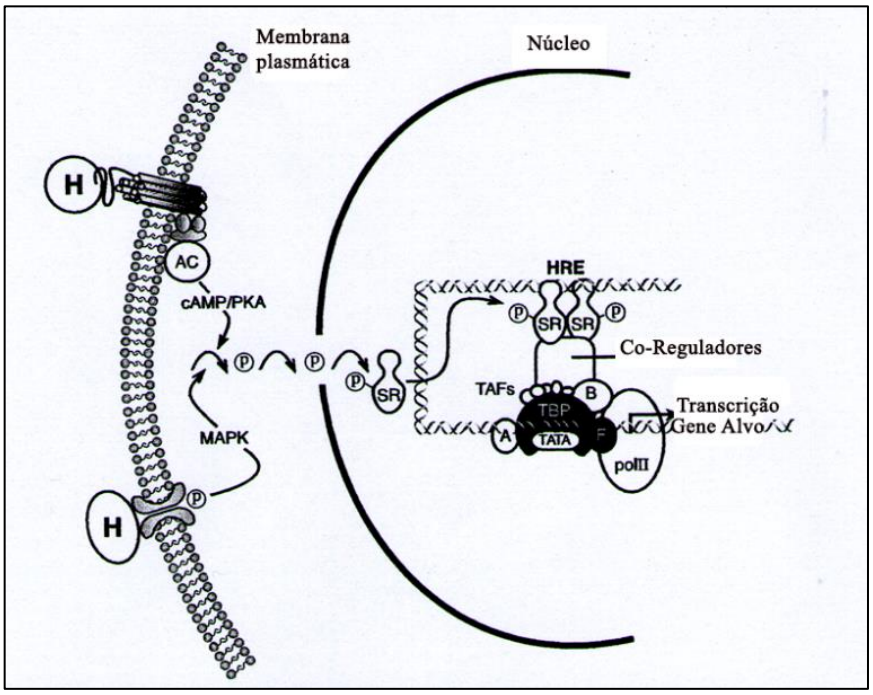
A bioquímica geral dos receptores e sua ativação dependente de ligante, é referida como “o modelo clássico” de função dos receptores (Figura 8). Vários mecanismos alternativos de sinalização do receptor, os quais diferem do modelo clássico, têm sido propostos, incluindo: (i) *cross-talk* com sistemas 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



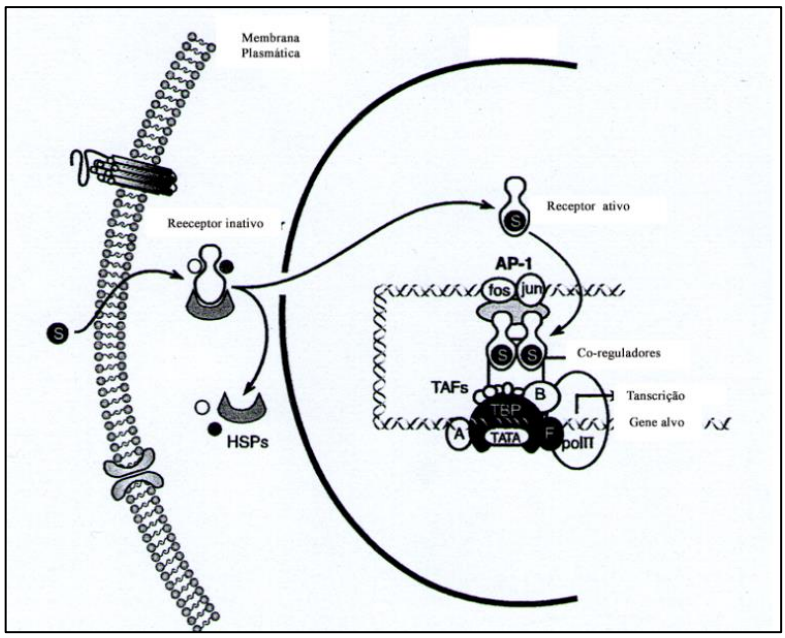
S: esteroide; HRE, elementos responsivos ao hormônio; HSPs: proteínas de choque térmico; TBP, TATA: proteínas de ligação; TAFs,TBP: Fatores associados; poli II: RNA polimerase.
Fonte: Adaptado do Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction, 3er ed. 2006

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



A estimulação hormonal do receptor ativa a cascada de sinalização das quinasses 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 quinasse 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 mantem (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 critica 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 especificas 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 el al., 2001)

Camundongos *nocaute* 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 *nocaute* para PR-A exibem uma um fenótipo semelhante ao observado às fêmeas *nocaute* para ambos receptores (Conneely et al., 2002). Contrariamente, em fêmeas *nocaute* 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 critica 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-ovulatoria 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 ovarectomizadas 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 deciduais 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 deciduais humanas, de ratas e camundongos fêmeas, confirmaram os resultados de Kisalus, mostrando que as células deciduais 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 deciduais 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.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo permite concluir que:

1. A composição da matriz extracelular do deciduoma 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 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.

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 deciduoma.

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

REFERÊNCIAS[1]

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. Estableciemento 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 isofrom 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 decicuais 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 (ERα) and estrogen receptor-β (ERβ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-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 Phusiology 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 Pseudográvidas em Cultivo Primario: Análise Ultra-Estructural 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. 17β-Estradiol and 17α-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. Glycosaminoglucans: 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. 11ª 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,LittleCD. 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,YasuoT. 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 Hoeck 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, Darnel 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 ERα and ERβ. Mol Interv. 2003,3(5):281-92

Martello EM, Abrahamsohn 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. Disponivel em: http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGA04E.html

Monice FL. Involução do deciduoma induzido em camundongos pseudográvidos : 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 deciduoma de camundongos fêmeas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2000.

Nilsson B, De Luca S, Lohmander S, Hascall VCStructures 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/EBPβ) 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, Seriolo 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, Aruldhas MM, Govindarajulu P. Impact of oestradiol and progesterone on the glycosaminoglycans and their depolymerizing enzymes of the rat mammary glandActa 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 deciduais. InCarvalho H e Collares-Buzato C, editores. Células:uma abordagem multidisciplinar.São Paulo;Manole Ltda. 2005. p.346-55.