

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INVASÃO DECIDUAL PELO TROFOBLASTO DURANTE A IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA
EM **Calomys callosus**

JULIANA GONZAGA DE OLIVEIRA

PROF.^a MS. ELOISA AMÁLIA VIEIRA FERRO
Professora Orientadora

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG.
dezembro/1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INVASÃO DECIDUAL PELO TROFOBlasto DURANTE A IMPLANTAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM **Calomys callosus**

JULIANA GONZAGA DE OLIVEIRA

Aprovada pela comissão examinadora em 30/11/1995. Conceito: 7
300,0

Profª MS Eloisa Amália Vieira Ferro
Orientadora

Profª Dr. Maria Lúcia Prada de Almeida
Conselheira

Profª MS Marcelo Emílio Beletti
Conselheiro


Profª MS Nora-Ney Santos Barcelos
Coordenadora do Curso

Uberlândia - MG.
dezembro/1995

“E que chega para o homem a hora da decisão: o momento inevitável de dar um rumo ao todo da vida e descobrir um sentido ao tempo de viver. Muitos são os caminhos, porém, outras tantas escolhas.

Cabe a cada homem, a iniciativa de trilhar o seu caminho. Cabe a cada um de nós, a coragem de assumir a própria escolha.”

Autor desconhecido.

A meus pais,

Luis Eduardo e

Carmem Luiza,

pela lição de amor, carinho, compreensão, paciência
e dedicação que agradeço do fundo do meu coração.

Agradecimento especial

À professora Eloisa Amália Vieira Ferro, pelo exemplo de competência e paixão em seu trabalho, o qual significou muito para mim.

Agradecimentos

- À Deus, por sua constante presença;
- À Eloisa, por mostrar-se amiga nas hora certas;
- Aos colegas de graduação pelos anos de convivência;
- Aos professores que ajudaram a construir meu caminho;
- À Édna pela sua amizade e por ser prestativa a qualquer hora;
- Ao Sr. Hélió H. Werneck pela amizade, pelo processamento do material para microscopia eletrônica e pela documentação fotográfica;
- À Priscila, Sandra e Marcelo; e muitos outros pela força e amizade diária que me deram para que eu chegasse ao fim deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	
I - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Aspectos gerais.....	1
1.2 - Estágios iniciais da implantação.....	3
1.2.1 - Aposição.....	3
1.2.2 - Adesão.....	4
1.2.3 - Invasão.....	6
1.3 - Mudanças no estroma endometrial.....	8
1.4 - Calomys callosus	9
1.5 - Etapas iniciais na implantação embrionária em Calomys callosus	10
1.6 - Objetivos.....	12
II - MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 - Espécimes.....	13
2.2 - Acasalamento.....	13
2.3 - Colheita e processamento do material.....	14
2.4 - Fixação e processamento do material para microscopia de luz.....	14
2.5 - Fixação e processamento do material para microscopia eletrônica.....	15
III - RESULTADOS	17
IV - DISCUSSÃO	26
V - CONCLUSÕES	33
VI - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	35
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

Neste trabalho verificou-se a interação entre os organismos materno e embrionário durante a implantação embrionária em **Calomys callosus**. Foram sacrificadas fêmeas com três meses de idade, compreendendo da noite do 5.º dia à noite do 6.º dia de gestação. Coletou-se os cornos uterinos contendo os sítios de implantação sendo então fixados em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2% e incluídos em glicol metacrilato e Epon para a observação em microscópio de luz e eletrônico, respectivamente. **Na noite do 5.º dia de gestação**, o embrião encontrava-se em estágio avançado da implantação e células trofoblásticas gigantes foram observadas ultrapassando o epitélio uterino e invadindo o estroma endometrial. **Na madrugada do 6.º dia de gestação**, células trofoblásticas gigantes avançavam em direção aos vasos sanguíneos, onde pôde-se observar em seu citoplasma células sanguíneas aparentemente aprisionadas, como também, células epiteliais e deciduais, podendo estas estarem com aspecto sadio ou não. **Na manhã do 6.º dia de gestação**, o embrião apresentou o início da cavidade pró-amniótica e células trofoblásticas gigantes continuaram a invasão de vasos sanguíneos e estroma endometrial. **Na tarde do 6.º dia de gestação**, o embrião apresentou-se mais celularizado, e nas células deciduais ~~foi~~ observado grandes acúmulos de glicogênio. **Na noite do 6.º dia de gestação**, o embrião apresentou uma acentuada mudança morfológica, onde a cavidade pró-amniótica estava totalmente formada; no estroma endometrial foi observado um aumento no número de vasos sanguíneos na região mesometrial. Células trofoblásticas gigantes foram flagradas englobando fragmentos de células deciduais aparentemente sadias.

I- INTRODUÇÃO:

1.1- Aspectos gerais:

A interiorização da prole através da implantação embrionária, mecanismo adotado pelos mamíferos, trouxe um significativo passo evolutivo, uma vez que fica dispensado o cuidado da futura prole durante o período de desenvolvimento embrionário. Assim, o animal torna-se livre para buscar seu alimento, fugir de predadores e buscar proteção em outras localidades, sem ter que se preocupar com a segurança de sua futura prole.

Implantação embrionária é o processo pelo qual o embrião assume uma posição fixa no útero e inicia uma relação de grande intimidade com o organismo materno. No momento da implantação o embrião encontra-se na fase de blastocisto onde pode-se reconhecer duas classes de células: **a) massa celular interna ou embrioblasto**, um compacto conjunto de células que se acumulam em um dos pólos do embrião e, **b) trofoblasto**, formado por um conjunto de células achatadas que reveste a massa celular interna e a blastocèle. Durante toda a gestação, são as células trofoblásticas que interagem diretamente com o organismo materno. O trofoblasto apresenta duas funções básicas : 1.ª) promover

a fixação do embrião à mucosa uterina e, 2.ª) promover a fagocitose de elementos maternos em fases que antecedem a formação da placenta.

O trofoblasto assume diferentes comportamentos dependentes de sua localização. O trofoblasto polar, que cobre a massa celular interna, parece ser o grande centro proliferativo, fornecedor das células trofoblásticas restantes (Copp, 1979). As células trofoblásticas polares, dão origem ao cone ectoplacentário e ao ectoderma extra-embrionário, que contribuirão para a formação da porção fetal da placenta (Rossant & Tamura-Lis, 1981; Rossant & Croy, 1985).

A partir de células inicialmente achatadas que revestem a blastocèle, chamada trofoblasto mural, ocorre a transformação gradativa em células trofoblásticas gigantes, cuja principal característica é a aquisição de capacidade invasiva e fagocitária (Ilgren, 1983; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988). São as células gigantes, inicialmente as primárias e mais tardiamente as secundárias, que estão comprometidas com a invasão do epitélio uterino, do estroma endometrial e dos vasos sanguíneos maternos.

Além de proporcionar o alojamento do embrião no estroma endometrial, as células trofoblásticas gigantes são as principais responsáveis pelo fornecimento dos nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário, à partir da fagocitose de elementos maternos e da absorção de metabólitos do sangue materno, antes do estabelecimento da placenta. A estas células também cabe a síntese de hormônios esteróides (Botte et alii, 1968), de gonadotrofina coriônica (Wide & Wide, 1979) e hormônio lactogênico placentário (Soares, 1987).

Em **Calomys callosus**, desde os primeiros contatos do trofoblasto com a decídua, ocorre invasão de vasos sanguíneos endometriais com extravasamento de sangue materno, sendo notada intensa fagocitose de elementos sanguíneos pelo trofoblasto, provavelmente relacionada à aquisição e transferência de metabólitos para o desenvolvimento embrionário antes da formação da placenta (Ferro, 1991).

A implantação do embrião nos mamíferos pode ocorrer de três maneiras diferentes:

1) CENTRAL- quando o embrião cresce na luz do útero e apresenta diferentes graus de contato com a mucosa uterina. Este tipo ocorre na maioria dos animais domésticos.

2) EXCÊNTRICA - quando o embrião cresce dentro de uma prega da mucosa uterina até se tornar recoberto por esta e torna-se intersticial na espessura do endométrio. Isto acontece em ratos, hamster, "calomys" e camundongos.

3) INTERSTICIAL- quando o trofoblasto corrói o endométrio e o embrião aloja-se na espessura do mesmo. Ocorre em primatas, cobaia e morcego.

1.2- Estágios iniciais da implantação :

Na implantação excêntrica e intersticial estão envolvidos os processos de aposição, adesão e invasão; já na central só ocorre a aposição e adesão.

1.2.1- Aposição:

A fase de aposição caracteriza-se pela aproximação gradual dos organismos materno e embrionário de modo que o contato entre o trofoblasto e o epitélio uterino torna-se progressivamente mais íntimo. Nesta fase o blastocisto pode ser deslocado por lavagem na luz uterina, indicando que ainda não existem conexões firmes entre o trofoblasto e o epitélio uterino.

Numa etapa mais avançada desta fase observa-se uma progressiva associação entre as membranas do trofoblasto e do epitélio uterino. Em camundongos comprovou-se que a fase de aposição está relacionada com a progesterona, pois em camundongos ovariectomizados a luz uterina permanece

aberta; após o tratamento com progesterona ocorre um estreitamento da luz uterina e uma progressiva interdigitação entre as membranas do trofoblasto e epitélio uterino (Martin et alii, 1970; Hedlund & Nilsson, 1971).

A aposição do embrião ao epitélio uterino é variada em diferentes espécies. Em ratos e camundongos, nas fases iniciais de implantação, há um estreitamento da luz uterina ao redor do embrião e, aparentemente, o útero abraça o blastocisto (Enders & Schlafke, 1967); já em martas e macacos Rhesus o blastocisto é que aparentemente propicia a aproximação com o epitélio uterino, aumentando seu volume e preenchendo a luz uterina (Hedlund et alii, 1972; Enders et alii, 1983). Ambos os mecanismos favorecem a aproximação entre embrião e endométrio, iniciando uma etapa que levará a imobilização do embrião dentro do útero.

1.2.2- Adesão:

Na fase de adesão, extensas áreas de membrana das células trofoblásticas mantêm estreita proximidade com as membranas apicais das células epiteliais; as membranas se dispõem paralelas entre si separadas por um espaço de 15 a 20 *nm*. A fase de adesão é dependente de níveis hormonais maternos uma vez que camundongas ovariectomizadas grávidas só apresentam uma fase de adesão típica quando tratadas com estrógeno e progesterona.

Estudos têm sido conduzidos no sentido de caracterizar as bases moleculares envolvidas no processo de adesão.

Durante o processo de implantação embrionária ocorre uma perda generalizada de sítios ânionicos no epitélio uterino, bem como uma diminuição na espessura do glicocálix. Em coelhos (Anderson & Hoffman, 1984), em ratos (Hewitt et alii, 1979), em camundongos (Chaves & Anderson, 1985) estas alterações aparentemente não dependem da presença do embrião. Em furão entretanto, o glicocálix uterino só se reduz em espessura nas regiões em que o embrião faz contato com o útero, indicando uma possível participação embrionária na

modificação da superfície epitelial (Enders & Schlafke, 1972). Com a redução da espessura do glicocálix uma série de sítios específicos de ligação, antes mascarados, poderiam estar sendo expostos, favorecendo o mecanismo de adesão.

Além disso, cogita-se a participação de glicoproteínas na aquisição de adesividade pelo blastocisto durante a implantação. Sherman et alii, (1979) relataram a presença de colágeno do tipo III na superfície do blastocisto e sugerem a participação desta glicoproteína no processo de adesão do blastocisto ao epitélio uterino.

Outros autores sugerem a participação de proteoglicanas e glicosaminoglicanas durante a fase de adesão. Dzeiadek et alii, (1985); Farach et alii, (1987), demonstraram a presença de heparan sulfato na superfície do blastocisto e a expressão desta molécula está aumentada durante a fase de aposição . A inibição desta glicosamonoglicana inibe a adesão do blastocisto a uma grande variedade de substratos "in vitro" (Farach et alii, 1988). Carson et alii, (1990) mostraram que proteínas que se ligam exclusivamente ao heparan sulfato estão presentes na superfície de células epiteliais uterinas durante a fase de implantação embrionária.

Assim, as interações mediadas pelo heparan sulfato devem ser consideradas como fator importante no processo de adesão do embrião ao epitélio uterino.

Apesar de numerosos estudos no sentido de caracterizar as moléculas e os mecanismos envolvidos no processo de adesão, até o momento não se sabe definitivamente todos os elementos envolvidos e as alterações fisiológicas que permitem a adesão do organismo embrionário e materno.

1.2.3- Invasão:

Ocorrida a adesão ao epitélio uterino inicia-se o processo de invasão que é variável de espécie para espécie. Ao final deste processo os embriões ganharão acesso ao estroma endometrial estabelecendo definitivamente uma relação de grande intimidade com o organismo materno. Segundo Schlafke & Enders (1975), três são os mecanismos básicos adotados pelo trofoblasto para promover a invasão:

A) INTRUSÃO:

Após ter ocorrido a adesão do trofoblasto ao epitélio uterino, prolongamentos do trofoblasto penetram pelas laterais das células epiteliais rompendo seus complexos unitivos e atinge a membrana basal, rompendo-a posteriormente, e atingindo o tecido conjuntivo subjacente. As células epiteliais circundadas pelas células trofoblásticas morrem e são fagocitadas pelo trofoblasto e as demais células vizinhas, não envolvidas pelo trofoblasto, mantêm-se íntegras. Este tipo de invasão ocorre em furão (Enders & Schlafke, 1972).

B) DESLOCAMENTO:

Neste tipo de implantação, como pré-requisito, é necessário que existam áreas de degeneração celular no epitélio uterino. O mecanismo exato que explique o processo de degeneração e morte das células epiteliais não é conhecido. Células trofoblásticas em contato com células epiteliais degeneradas enviam prolongamentos em suas direções, englobando-as e fagocitando-as, alcançando desta maneira a lâmina basal. Uma vez em contato com esta, o trofoblasto emite prolongamentos laterais em direção às células vizinhas aparentemente saudáveis, deslocando-as da lâmina basal. Após este processo ocorre o rompimento da lâmina basal quer seja por participação de célula decidual, como em ratos (Schlafke et alii, 1985), ou por ação de células trofoblásticas, como em

camundongos (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989) e *Calomys* (Ferro e Bevilacqua, 1994).

C) FUSÃO:

Neste tipo de invasão ocorre a fusão do sinciciotrofoblasto com a superfície epitelial da membrana plasmática de células epiteliais, a intervalos regulares, e as células epiteliais que se fusionaram ao trofoblasto permanecem unidas lateralmente às células vizinhas. Nos locais onde não houve fusão do trofoblasto ao epitélio uterino ocorre uma interdigitação com projeções filiformes do trofoblasto com microvilosidades do epitélio uterino. Em etapas posteriores ocorre a fusão de células vizinhas, formando simplasmas epiteliais aos quais ocorrerá a fusão de novas células trofoblásticas. Posteriormente, o sinciciotrofoblasto fusionado ao epitélio uterino rompe a lâmina basal e caminha em direção aos vasos sanguíneos materno. Este tipo de invasão é encontrado em coelhos (Larsen, 1961; Steer, 1970, 1971; Enders & Schlafke, 1971).

A invasão do estroma endometrial é particularmente acentuada nas espécies que apresentam placentação do tipo hemocorial, que incluem o homem e os roedores. Nestas espécies, as células trofoblásticas invadem o estroma endometrial, alcançam e rompem os vasos sanguíneos, estabelecendo um contato direto com o sangue materno. Frequentemente os aspectos invasivos destas células são comparados aos de células tumorais malignas (Ferro, 1991).

Durante o processo de invasão em ratos (Welsh & Enders, 1987) e camundongos (Bevilacqua, 1984), após uma breve fase de adesão à lâmina basal dos vasos endometriais, prolongamentos de células trofoblásticas foram observados penetrando por entre células endoteliais. A capacidade invasiva do trofoblasto é acompanhada de atividade fagocitária em muitas espécies.

O contato direto de células trofoblásticas com o sangue materno parece garantir de um modo mais rápido e eficiente, o acesso de hormônio gonadotrófico

ao organismo materno e suprimento nutritivo ao organismo embrionário em desenvolvimento.

1.3) Mudanças no estroma endometrial:

Em muitas espécies, dentre elas primatas e roedores, durante a fase de implantação embrionária, o estroma uterino sofre uma série de transformações que se inicia com um aumento da permeabilidade vascular (Psychoyos, 1960) e culminam com profundas modificações no tecido conjuntivo endometrial, que levam à formação da decídua. Isto se dá, através do aumento das células deciduais, tornando-se poliplóides, acumulando glicogênio e lípidos em seus citoplasmas, alterando quantitativamente e qualitativamente seu conteúdo organelar e desenvolvendo extensos contatos intercelulares através de complexos juncionais (Kerhbiel, 1937; Abrahamson, 1983).

A primeira região do útero a sofrer decidualização é a antimesometrial, e este processo caminha de maneira centrífuga, partindo da região subepitelial em direção ao miométrio. A região antimesometrial está localizada na parede uterina oposta à inserção do mesométrio. Na região mesometrial, o processo de decidualização ocorre mais tardiamente e está intimamente relacionado com a formação da porção materna da placenta.

As células deciduais podem ser caracterizadas por apresentar forma poliédrica, núcleos de cromatina frouxa, nucléolo evidente e poliploidia. O citoplasma destas células caracteriza-se por ser timidamente basófilo, conter acúmulos de lípidos e glicogênio. Estas células mantêm reduzido espaço intercelular e estabelecem contatos intercelulares através de junções do tipo **gap** e **adherens** (Reinius, 1967; Abrahamsohn, 1983). Pode-se notar também a presença marcante de fibrilas colágenas espessadas na matriz extracelular (Alberto-Rincon et alii, 1989).

Dentre as muitas funções atribuídas às células decíduais, podemos destacar a produção de hormônios (Herz et alii, 1985), uma provável participação no mecanismo imunológico que previne a rejeição do embrião (Lala et alii, 1986) e a contenção da invasividade trofoblástica (Kirby, 1965).

1.4) *Calomys callosus* :

A superfamília Muroidea abriga grande número de espécies de roedores que habitam todo o mundo. Incluídos nesta superfamília temos as famílias - **Cricetidae**, à qual pertencem os hamsters, "voles" e "Calomys"; e - **Muridae** que incluem os ratos e camundongos.

Alguns cricetídeos, especialmente os do hemisfério norte, têm se mostrado bastante adaptáveis, quando mantidos em cativeiro, tornando-se assim animais de utilização comum em laboratório. Isto tem proporcionado um melhor conhecimento dos diferentes aspectos de sua biologia, em todas as áreas de estudo.

Calomys callosus é um cricetídeo predominantemente sul-americano, sendo encontrado em diferentes regiões no território brasileiro.

Socialmente, estes animais apresentam relevante importância por serem reservatórios naturais de **Tripanossoma cruzi** (Ribeiro, 1973), o agente etiológico da doença de Chagas e transmissores da febre hemorrágica argentina (Justines & Johnsohn, 1969).

Esses animais também têm-se mostrado altamente susceptíveis a doenças infecciosas tais como esquistossomose, leishimaniose (Mello, 1977) e toxoplasmose (Favoretto & Ferro, comunicação pessoal), o que tem proporcionado um excelente modelo biológico para o estudo destas doenças. Baseado nestes achados, atualmente existe uma forte tendência para uma ampla utilização em laboratório desta espécie.

Do ponto de vista reprodutivo, pôde ser estabelecido tratarem-se de animais poliétricos com ciclo estral de aproximadamente seis dias e período gestacional de cerca de vinte e dois dias (Mello, 1978).

Em microscopia de luz, estudos sobre o processo de implantação embrionária desta espécie, mostraram que este evento se inicia precocemente no quarto dia de gestação e que se processa muito mais rapidamente do que o observado em outras espécies de roedores (Ferro, 1991).

A invasão do estroma endometrial e de seus vasos sangüíneos, por ser bastante precoce, leva ao estabelecimento de uma efetiva região de trocas metabólicas entre células trofoblásticas e sangue materno extravasado, logo nas primeiras horas após ter se iniciado o processo de implantação nestes animais.

1.5) Etapas iniciais na implantação embrionária em *Calomys callosus*

Ferro (1991) estabeleceu que, o processo de implantação embrionária em **Calomys callosus** inicia-se, precocemente, na tarde do 4.º dia de gestação, através da aproximação do blastocisto à parede uterina, caracterizando a fase de aposição.

Uma vez iniciado o contato com o organismo materno através do epitélio uterino, as células trofoblásticas das laterais embrionárias alteram rapidamente seu padrão morfológico e iniciam um processo de agigantamento, que prossegue em direção ao pólo abembrionário. A formação das células trofoblásticas gigantes coincidem com o aparecimento de duas importantes atividades: invasividade e fagocitose.

Na manhã do quarto dia de gestação já podem ser notados sinais indicativos do processo de decidualização, principalmente na região antimesometrial da parede uterina, sendo que à noite a decídua está totalmente diferenciada.

Na noite do 4.º dia de gestação, um contato muito mais íntimo se estabelece entre o organismo embrionário e materno. A típica interdigitação de microvilos entre trofoblasto e epitélio, que é encontrada na fase de adesão em outros roedores, não é observada neste animais.

Em **Calomys callosus**, a invasão e remoção do epitélio uterino se sucedem em um período bastante curto. Durante a noite do 4.º dia de gestação, o epitélio da cripta uterina em contato com as laterais embrionárias é invadido pelas células trofoblásticas e totalmente removido por fagocitose.

Tão logo as células trofoblásticas ultrapassem a barreira epitelial, entram em contato com os componentes do estroma endometrial. Isto ocorre a partir da manhã do quinto dia de gestação. Nesta fase o estroma endometrial ao redor do embrião encontra-se plenamente decidualizado.

Durante o decorrer do 5.º dia de gestação, a invasão por parte do trofoblasto prossegue através da penetração de suas projeções por entre as células deciduais, apesar do arranjo hermeticamente compacto e da grande quantidade de junções intercelulares desta estrutura, atingindo vasos sangüíneos endometriais provocando extravasamento de sangue materno e conseqüentemente, fagocitose dos elementos sangüíneos.

Objetivos:

Pretende-se definir a relação entre as células deciduais e trofoblásticas, durante a implantação do embrião entre o período da noite do quinto dia até a noite do sexto dia de gravidez. Para tal, serão examinados sítios de implantação ao nível de microscopia de luz e eletrônica, com o objetivo de:

- Caracterizar os aspectos invasivos e fagocitários da célula trofoblástica;
- Descrever a interação materno-embriónica envolvendo a relação entre trofoblasto e decídua;
- Analisar as modificações celulares que ocorrem no organismo materno;
- Definir o padrão de implantação em **Calomys callosus**.

II- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Espécimes:

Calomys callosus (linhagem canabrava) oriundos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo foram utilizados ao atingirem a idade de três meses. Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, com dieta **ad libitum** de água e ração granulada, complementada com semente de girassol, aveia e milho.

2.2) Acasalamento:

O acasalamento deu-se na proporção de uma fêmea virgem para cada macho. As fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos por volta das 18 horas de cada dia. Na manhã seguinte, a constatação do acasalamento foi detectada pela presença da rolha vaginal. Considerou-se o primeiro dia de gestação aquele em que cuja manhã foi observada a presença da rolha vaginal.

2.3) Colheita e processamento do material:

Com o intuito de se flagrar o maior número possível de etapas do processo de implantação embrionária, foram realizadas colheitas de sítios de implantação de acordo com o seguinte esquema:

Dia	Horário	N.º de indivíduos
Noite do 5.º dia	20:00-23:00	2 animais
Madrugada do 6.º dia	02:00-04:00	2 animais
Manhã do 6.º dia	10:00-12:00	2 animais
Tarde do 6.º dia	14:00-16:00	2 animais
Noite do 6.º dia	20:00-23:00	2 animais

2.4- Fixação e processamento do material para microscopia de luz:

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico. Após laparotomia, os cornos uterinos foram retirados do corpo do animal, mantidos em placas de Petri contendo solução fixadora, onde foram dissecados e recortados transversalmente, em relação ao seu maior eixo, em segmentos de dois a três milímetros de espessura.

Para fixação, estas peças foram mantidas em uma mistura de etanol 95%, formalina, ácido acético glacial e água destilada na proporção de 3:1:1:5 em volume (Finn & McLaren, 1967) durante 18 horas. À fixação, seguiu-se a desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 50 a 100%), após o que os materiais foram pré-infiltrados em uma mistura 1:1 de glicol metacrilato ¹ e etanol absoluto por 2 horas a temperatura ambiente, sendo depois imersos em solução infiltradora ² por 24 horas e incluídos em uma mistura ³ da resina a temperatura ambiente.

¹Resina Glicol Metacrilato Historesin, LKB2218-500, Sweden.

²Solução infiltradora : -50ml de resina básica (Glicol Metacrilato)

-5g de ativador (peróxido de benzoila)

³15ml de solução infiltradora e 1ml de endurecedor (derivado de ácido barbitúrico-DMSO).

Cortes de $2\mu\text{m}$ de espessura foram executados em um micrótomo automático Leica 2065 e corados pela técnica da hematoxilina e eosina ou pelo azul de toluidina a 0,25% em água destilada a $40.^{\circ}\text{C}$.

2.5- Fixação e processamento do material para microscopia eletrônica:

Após anestesia através de inalação de éter etílico, os animais foram laparotomizados e seus cornos uterinos retirados. Sob microscópio estereoscópio e imersos em solução fixadora, os sítios de implantação foram dissecados do miométrio e seccionados transversalmente em fatias de aproximadamente $1,5\text{ mm}$, permanecendo na solução fixadora por 12 horas a $4.^{\circ}\text{C}$. A solução fixadora utilizada foi o glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (Karnovsky, 1965, modificado).

Uma vez fixados, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e pós-fixados em tetróxido de Ósmio a 1% em cloreto de sódio 0,9% em água destilada durante 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram então submetidos a uma bateria de desidratação em etanóis de concentrações crescentes (50-100%), sendo então infiltrados por tolueno.

Posteriormente, os fragmentos permaneceram, durante 12 horas, numa mistura em partes iguais de tolueno e resina Epon⁴. Após o que foram mantidos por uma hora em resina pura a $60.^{\circ}\text{C}$ e então incluídos em uma nova resina pura e orientados de modo a obtermos cortes transversais ao útero. Para polimerização da resina, os blocos permaneceram em estufa a $60.^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Cortes semi-seriados de $2\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos em um micrótomo automático Leica 2065 a fim de localizar os embriões nas criptas uterinas. Os cortes foram então

⁴Resina Epon: - 15ml de Epon 812 Fluka

- 9ml de 2- Dodecenil-1-succinic anhydride mixture (DDSA)
- 10ml de Methyl Nadic Anhydride (MNA)
- 0,5ml de Epoxy accelerator (DMP-30)

corados com azul de toluidina a 0,25% em borato de sódio a 1% em água destilada.

Uma vez localizadas as regiões de implantação embrionária, cortes ultra-finos prateados foram obtidos em um ultramicrótomo automático Reichet-Jung modelo Ultracut. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uralina 2% em água destilada durante 5 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada, durante 10 minutos.

A observação ultra-estrutural e documentação fotográfica foi realizada em um microscópio eletrônico ZEISS EM 109.

III - Resultados

Os resultados apresentados foram baseados na análise dos aspectos celulares e na interação materno-embriónica. Para melhor entendimento, estes foram divididos em **epitélio uterino**, o qual foi descrito a nível de localização e aspecto celular; **estroma uterino**, refere-se à decídua, sua formação e aspecto com o qual esta se apresenta no decorrer do período; **embrião**, aqui dedicou-se maior atenção ao trofoblasto, pois este apresenta-se como a célula chave para o estudo; e finalmente, **interação materno embriónica** onde relatou-se a maneira pela qual mãe e conceito interagem durante o período estudado.

NOITE DO 5.º DIA DE GESTAÇÃO

Epitélio Uterino

Na noite do 5.º dia células epiteliais foram observadas apenas na região mesometrial e no fundo da cripta uterina. Tais células mostravam-se íntegras, bem conservadas e em uma monocamada prismática (fig. 1).

Embrião

O embrião situava-se na porção antimesometrial da cripta uterina e estava totalmente envolto pelo estroma endometrial. Além do trofoblasto e do ectoderma, pôde-se distinguir o saco vitelino delimitado pelo endoderma visceral e parietal (fig.1). No pólo embrionário foi observada a presença do cone ectoplacentário (fig.1), futura porção fetal da placenta e o centro de proliferação mitótica, fornecedora de células gigantes secundárias.

Ao redor do embrião, células trofoblásticas gigantes eram de fácil identificação tanto pelo seu tamanho, bem maiores que as do estroma, quanto por sua forma, pois possuíam prolongamentos citoplasmáticos, os quais ocupavam os estreitos espaços por entre as células do estroma (fig.1).

No citoplasma das células trofoblásticas foi observado pontos com maior intensidade cromática. O núcleo apresentava cromatina descondensada com nucléolos evidentes (fig.2).

Ao microscópio eletrônico o citoplasma das células trofoblásticas caracterizava-se por apresentar: mitocôndrias, polirribossomas livres, retículo endoplasmático granular, filamentos intermediários e Complexo de Golgi.

Em algumas células trofoblásticas foi possível observar que o citoplasma apresentava-se repleto de vacúolos, com material elétron-denso e granular e, também, células epiteliais com maior elétron-densidade; nesta situação era comum

a presença de grande parte do citoplasma da célula trofoblástica sobre a membrana basal do epitélio uterino (fig.3).

Células trofoblásticas foram observadas emitindo prolongamentos no sentido de englobar células decíduais (fig.4).

Estroma endometrial

O estroma endometrial apresentava células em diferentes graus de compactação, próximo ao embrião apresentaram-se compactadas, lembrando um tecido epitelíode, próximo ao miométrio as células mostraram arranjo típico de tecido conjuntivo frouxo, já a região média mostrou características intermediárias entre as duas camadas (fig.5).

Ao microscópio eletrônico as células decíduais apresentavam núcleo de cromatina descondensada e nucléolo proeminente, no citoplasma observou-se retículo endoplasmático granular, polirribossomas livres e acúmulos de glicogênio (fig. 6). No citoplasma também observou-se vacúolos alongados com material elétron-denso nas laterais e no interior um material fibrilar com estriações transversais, lembrando fibrilas colágenas. No limite celular, pôde-se observar inúmeras junções **gap** (fig.6).

Próximas ao embrião algumas células decíduais apresentaram características alteradas, com organelas bem dilatadas, forma irregular e maior elétron-densidade (fig.7).

Interação materno-embrionária

Na noite do 5.º dia o embrião apresentava-se em estágio avançado de implantação, de tal maneira que a interação entre os organismos materno e embrionário se fez de forma muito íntima.

Células trofoblásticas gigantes, responsáveis pelo avanço do embrião, avançaram para o interior do estroma endometrial, ultrapassando o epitélio uterino e a lâmina basal. Este acontecimento deu-se através da emissão de prolongamentos citoplasmáticos de células trofoblásticas por entre as células epiteliais, rompendo os complexos unitivos e, quando em contato com a lâmina basal, emitia prolongamentos sob epitélio e sobre a lâmina basal e, em seguida, deslocava tais células epiteliais da lâmina basal (fig.8), fagocitando-as e, finalmente rompia a lâmina basal e avançava em direção ao estroma endometrial (fig.9).

Concomitante ao processo de invasão do estroma endometrial, notou-se o resultado da invasão de vasos por parte de células trofoblásticas com conseqüente fagocitose de células sangüíneas (fig.10).

Células trofoblásticas foram flagradas aprisionando células deciduais com maior eletron-densidade e organelas vacuoladas, aparentando células em processo de degeneração (fig.11). Em outras situações observou-se células trofoblásticas apenas emitindo prolongamentos por entre células do estroma endometrial sem nenhuma alteração que indicasse processo de degeneração.

MADRUGADA DO 6.º DIA DE GESTAÇÃO

Epitélio uterino

Na madrugada do 6.º dia o epitélio uterino restringiu-se apenas ao alto da cripta, na região mesometrial. Suas células apresentaram-se aparentemente bem conservadas.

Embrião

O embrião apresentava morfologia muito semelhante à fase anterior. Exceto o fato de início de um processo de cavitação na parte ectodérmica, sugerindo ser a cavidade pró-amniótica (fig.12).

Estroma endometrial

As características morfológicas simulavam as da fase anterior, mantendo o mesmo arranjo compacto próximo ao embrião e tornando-se mais frouxo à medida que se aproxima o miométrio.

As características ultra-estruturais se mantiveram, exceto o fato de existir grande quantidade de fibrilas colágenas no espaço extracelular (fig.13).

Interação materno-embrionária

Nesta fase da implantação embrionária organismos materno e embrionário exibiram amplas áreas de contato entre células trofoblásticas e deciduais.

Células trofoblásticas invadiram o estroma endometrial através da interposição de finos prolongamentos citoplasmáticos colocando-se por entre os estreitos espaços intercelulares (fig.14). Observou-se também que células trofoblásticas invadiram as células endoteliais de modo a se apresentarem em contato com a luz do vaso e conseqüentemente banhada por sangue materno (fig.15).

MANHÃ DO 6.º DIA DE GESTAÇÃO

Epitélio uterino

O epitélio uterino na manhã do 6.º dia, ainda estava presente, porém como na fase anterior, somente na região mesometrial. Algumas células epiteliais apresentaram maior intensidade cromática (fig. 16).

Embrião

Nesta fase o embrião apresentava uma cavidade pró-amniótica mais ampla, bem como o saco vitelino (fig. 17).

Células trofoblásticas gigantes entravam em contato direto com o estroma endometrial bem como com vasos sanguíneos através de prolongamentos citoplasmáticos.

Estroma endometrial

Nesta fase as células do estroma endometrial apresentavam características muito semelhantes a já descritas nas fases anteriores, exceto o fato de que na região intermediária era grande o número de células em processo de mitose (fig. 18).

Interação materno- embrionária

Na manhã do 6.º dia, a interação dos organismos materno e embrionário continuava com muita intensidade visto que pode-se flagrar em diferentes estágios, a intensa invasividade das células trofoblásticas. Isto se deu tanto por entre células

deciduais, com a emissão de prolongamentos citoplasmáticos das células trofoblásticas (fig. 19), como em direção aos vasos sanguíneos (fig. 20).

No citoplasma das células trofoblásticas era comum a presença de vacúolos elétron-densos lembrando a fagocitose de hemácias. Além de leucócitos aparentemente aprisionados no interior de células trofoblásticas; observou-se também material elétron-denso na forma de grumos (fig. 21).

TARDE DO 6.º DIA DE GESTAÇÃO

Epitélio uterino

Nesta fase o epitélio uterino não foi mais encontrado na mucosa uterina.

Embrião

O embrião apresentava-se mais celularizado. As demais características à cerca das células trofoblásticas permaneceram as mesmas das fases anteriores.

Estroma endometrial

O estroma endometrial mostrou-se totalmente decidualizado e mais compactado ao redor do embrião; as células desta região mostraram maior intensidade cromática. Aparentemente houve uma expansão do arranjo compacto do estroma em direção ao miométrio (fig. 22).

Ao microscópio eletrônico notou-se grande quantidade de acúmulos de glicogênio nas células deciduais, bem como maior elétron-densidade no espaço intercelular (fig. 23).

Interação materno-embriónica

As características que sugerem fagocitose tanto de células deciduais quanto de células sangüíneas mantiveram-se inalteradas quando comparadas com a manhã do 6.º dia.

NOITE DO 6.º DIA DE GESTAÇÃO

Embrião

Nesta fase o embrião caracterizava-se por apresentar a cavidade pró-amniótica totalmente formada, tomando quase todo seu interior, onde estava delimitada pela ectoderme. Externamente o endoderma parietal e visceral delimitavam o saco vitelino (fig. 24).

Células trofoblásticas apresentavam-se interpostas com grande intimidade por entre as células deciduais (fig. 24).

Estroma endometrial

Nesta fase observou-se algumas mudanças no estroma endometrial : vasos sangüíneos tornavam-se mais evidentes, especialmente na região mesometrial (fig. 25), maior compactação de células deciduais, próximas ao miométrio. O número de células deciduais em processo de degeneração tornou-se mais intenso (fig. 26).

Interação materno-embriónica

Na noite do 6.º dia, a interação entre organismos materno e embriónico se fez com muita intimidade.

Células trofoblásticas mostraram intensa atividade invasiva do estroma endometrial. A invasão de vasos foi freqüente. Mesmo quando este processo não era evidenciado diretamente, foi comum a presença de células sanguíneas maternas aparentemente aprisionadas no interior de células trofoblásticas (fig. 27).

Freqüentemente, notava-se células trofoblásticas emitindo prolongamentos no sentido de englobar porções de células decíduais, com características de células saudáveis (fig. 28), bem como prolongamentos que acompanhavam os contornos de células decíduais aparentemente degeneradas (fig. 29); esta última categoria de células provavelmente eram fagocitadas uma vez que foram encontradas células decíduais de características semelhantes aparentemente aprisionadas no interior de células trofoblásticas.

IV - DISCUSSÃO

Através da análise, ao microscópio de luz e ao microscópio eletrônico, dos elementos celulares materno e embrionário envolvidos na implantação embrionária do roedor **Calomys callosus**, foi verificado e diagnosticado o tipo de implantação ocorrida nesta espécie, bem como os fatos decorrentes deste evento: as modificações ocorridas no embrião, no estroma endometrial e as atividades invasivas e fagocíticas das células trofoblásticas.

A discussão será realizada em tópicos para que o entendimento dos aspectos celulares desta interação se torne claro.

EPITÉLIO UTERINO

Dentro do período estudado, o qual compreendeu desde a noite do 5.º dia até a noite do 6.º dia, o epitélio uterino foi observado até a manhã do 6.º dia. No período em que estava presente percebeu-se algumas células em processo de degeneração. A nível de microscopia de luz pôde-se observar uma maior intensidade cromática em seu citoplasma.

O processo de morte celular vem sendo estudado com muito interesse, porém ainda existe muita divergência entre os estudiosos no que se diz respeito a classificar o tipo de morte ocorrido.

Por um lado aparece aqueles que acreditam que, o que ocorre pode ser uma morte programada do tipo apoptose; e outros ainda acreditam que a morte ocorre de modo patológico, ou seja, por necrose.

Segundo Clarke (1990), [in: Ferro 1991], é questionável a atual tendência em se classificar os processos de morte celular em uma dicotomia: processos patológicos como necróticos, e os não patológicos como apoptóticos. Segundo este autor existem situações em que os padrões morfológicos de ambos tipos se misturam e se confundem, além de outros modelos comprovados de morte celular que também ocorrem em situações fisiológicas e que não enquadram nas definições de nenhum destes processos.

O presente estudo não teve como finalidade verificar esta dicotomia, porém num estudo anterior com esta mesma espécie, Ferro (1991), supõe que é provável que este seja o caso das células epiteliais uterinas, onde alterações tradicionalmente encontradas tanto em processos de morte por apoptose quanto por necrose podem ser observadas.

A fagocitose do epitélio uterino pelo trofoblasto inicia somente depois que as células epiteliais sofrem uma considerável deterioração (Hinchliffe e El-Shershaby, 1975). Segundo estes autores a deterioração das células epiteliais parece estimular

a atividade fagocítica das células trofoblásticas. Tais considerações coincidem com as características observadas no presente estudo.

Não foi possível estabelecer nenhuma relação de alteração morfológica das células epiteliais, com a presença de células trofoblásticas. É provável que as células epiteliais entrem em processo de alteração, seja ele apoptótico ou não, independente da presença do trofoblasto. Já o processo de fagocitose inicial de células epiteliais pelo trofoblasto deu-se apenas em locais onde exista células epiteliais degeneradas.

ESTROMA ENDOMETRIAL

No período estudado o estroma endometrial apresentava predominantemente decidualizado, podendo em alguns momentos revelar algumas diferenças dependendo da região observada, como totalmente decidualizado próximo ao embrião e com arranjo frouxo próximo ao miométrio.

As células deciduais apresentavam como principais características: forma poliédrica, citoplasma claro e núcleo com cromatina descondensada e com um ou mais nucléolos evidentes.

Ao nível de microscopia eletrônica foi observado no interior do citoplasma a presença de vacúolos alongados com material elétron-denso nas laterais e no interior um material fibrilar com estriações transversais lembrando fibrilas colágenas, sugerindo fagocitose de fibrilas colágenas. Segundo Parr et al, (1986) a presença de fibrilas colágenas no citoplasma das células deciduais é o resultado do processo de fagocitose de colágeno por estas células, com o intuito de remodelagem da matrix extracelular, sendo que esta remodelagem seria um evento indispensável para a expansão e crescimento do embrião.

Em nossos resultados também foi possível observar grande presença de filamentos intermediários no citoplasma das células decíduais. Zackroff et al, (1982) [in: Zorn et al, 90] sugere que estes filamentos intermediários estejam envolvidos numa série de funções celulares, sendo que uma destas pode ser a manutenção da forma celular; segundo Steinert et al, 84 (in: Zorn et al, 90) outras funções provavelmente seriam o envolvimento no movimento de organelas, centralização de núcleos e contatos de célula-célula.

Uma das mais interessantes descobertas na decídua do camundongo foi a íntima associação entre filamentos intermediários e fagossomas contendo colágeno, mostrando a interação entre lisossomas e elementos do citoesqueleto (Zorn et al, 1990).

Em **Calomys callosus** tanto: filamentos intermediários e fagossomas contendo colágeno foram observados, porém não nos foi possível flagrar nenhuma associação entre eles.

Foi notado a presença de grande quantidade de acúmulos de glicogênio, de maneira semelhante ao observado em ratos e camundongos por Welsh e Enders, (1985); e em hamster chinês por Blankeship et al, (1990); segundo estes autores a presença de glicogênio está associada a nutrição do embrião, em etapas que precedem a formação da placenta.

Outro aspecto notado na decídua desta espécie foi a presença de células decíduais com aspecto degenerado lembrando morte celular. De acordo com Katz e Abrahamsohn, (1987) [in: Abrahamsohn, et al, (1993)], em ratos e camundongos, células decíduais morrem por apoptose. Ainda segundo estes autores, células decíduais sadias resistem a invasão pelo trofoblasto, a morte gradual das células decíduais parece ser um mecanismo que permite a expansão do trofoblasto do camundongo.

Contudo no presente estudo foi observada uma situação diferente das obtidas com ratos e camundongos; além das células decíduais degeneradas, em

Calomys callosus, células decíduais sadias foram flagradas sendo fagocitadas pelo trofoblasto, podendo isto denotar que, nesta espécie, o trofoblasto não encontra na decídua uma barreira física, que o impeça de prosseguir seu avanço pelo estroma endometrial em busca de nutrientes para o embrião.

EMBRIÃO

Em nossas observações foi notado uma rápida alteração morfológica do embrião no curto espaço de tempo estudado. Na noite do 5.º dia o embrião mostrou um compacto amontoado de células, onde puderam ser diferenciadas as camadas de ectoderma e endoderma parietal e visceral; já na noite do 6.º dia foi observada a cavidade pró-amniótica totalmente formada, delimitada pelo ectoderma.

Segundo Snell (1941), no 5.º dia, em camundongos, também já inicia a formação da cavidade pró-amniótica, sendo esta delimitada pelo ectoderma embrionário. As demais camadas também já se apresentavam nesta fase.

Junto a estas transformações, foi observado o franco avanço do cone ectoplacentário em direção a porção mesometrial da decídua.

TROFOBLASTO

Foi observado que as células trofoblásticas apresentavam formas irregulares e tamanho bastante aumentado.

No decorrer do período sua localização foi bastante variada, podendo ser encontrada desde a região do epitélio uterino até em meio às células decíduais.

O que chamou bastante a atenção foi que à medida que as células trofoblásticas invadiam o estroma endometrial sua atividade fagocítica tornava-se

mais intensa. Isto pode ser notado através da presença de fragmentos de células epiteliais, decíduais e sangüíneas no seu citoplasma.

De maneira semelhante ao observado em **Calomys callosus**, Bevilacqua (1988) notou que o aumento da atividade fagocítica apresentada pelas células trofoblásticas gigantes em camundongos, foi indicada pelo acúmulo de corpos semelhantes a lisossomas. O acúmulo destes corpos nas células gigantes coincidem com o aparecimento de fagossomas contendo resíduos celulares.

A ativação de células trofoblásticas durante sua transformação em células gigantes é, deste modo, um importante passo no desenvolvimento da natureza invasiva e fagocítica do trofoblasto. Este fator é importante para a adaptação do embrião dentro do endométrio e é dependente da fagocitose ativa das células gigantes (Böving, 59; Billington, 71; Smith e Wilson, 74; Katz e Abrahamsohn, 87) [in: Bevilacqua et al, 88).

Para Enders et al (1967) as propriedades histolíticas e invasivas do trofoblasto primitivo do rato parecem ser muito fraca nos primeiros estágios de uma implantação normal, mas a adesão da membrana da célula trofoblástica com a membrana das células epiteliais parece ser um importante fator na ativação da atividade fagocítica do trofoblasto. Assim, o contato materno-embriônico agiria no sentido de estimular a atividade fagocítica do trofoblasto e propiciar a implantação embrionária.

INTERAÇÃO MATERNO-EMBRIONÁRIA

As células trofoblásticas gigantes, responsáveis pelo processo de implantação embrionária, avançavam para o interior do estroma endometrial, ultrapassando a barreira do epitélio uterino e seguindo em direção as células do

estroma endometrial. Este acontecimento deu-se através da emissão de prolongamentos citoplasmáticos de células trofoblásticas por entre as células epiteliais degeneradas, rompendo seus complexos unitivos e deslocando-as da lâmina basal, com posterior fagocitose de tais células degeneradas bem como de células laterais, com características de células saudáveis.

Após o deslocamento e fagocitose das células epiteliais, foi observado o avanço de prolongamentos citoplasmáticos das células trofoblásticas em direção ao estroma endometrial, onde provavelmente houve o rompimento da lâmina basal, com conseqüente invasão de células do estroma. Assim observou-se que o processo de implantação embrionária em **Calomys callosus** é, como na maioria dos roedores estudados (Abrahamsohn, 1983) do tipo deslocamento.

O rompimento da lâmina basal, representa um importante evento durante a implantação embrionária, pois para que ela ocorra, o embrião necessita atingir o estroma endometrial e isto só é possível após ultrapassada a lâmina basal. Porém podem estar envolvidos neste evento, tanto células decíduais (Schlafke, et al, 1985), como células trofoblásticas (Bevilacqua e Abrahamsohn, 1989; Ferro e Bevilacqua, 1994).

Ultrapassada a lâmina basal, as células trofoblásticas gigantes iniciaram a invasão ao estroma endometrial, conseguindo através da emissão de finos prolongamentos citoplasmáticos, romper os complexos unitivos que dão à decídua um arranjo extremamente compacto, e assim ganharam um amplo convívio com a matriz extracelular.

O franco avanço do trofoblasto ao estroma endometrial foi marcado pela fagocitose de células decíduais degeneradas predominantemente ou de aspecto saudável e, por fim, prolongamentos trofoblásticos alcançaram e invadiram os vasos sanguíneos, garantindo assim um vasto suprimento para o embrião.

V - CONCLUSÕES

- A atividade fagocítica das células trofoblásticas inicia com a fagocitose de células epiteliais degeneradas e evolui para a fagocitose de células epiteliais saudáveis. Uma vez em contato com o estroma endometrial as células trofoblásticas passam a abrir caminho no estroma com a fagocitose de células decíduais degeneradas, bem como a fagocitose de células decíduais saudáveis, atingindo assim os vasos maternos e garantindo um vasto suprimento sanguíneo em etapas que precedem a formação da placenta.
- O processo de decidualização do estroma endometrial, já presente quando iniciado este estudo, teve seu avanço progressivo no decorrer deste, onde pôde-se evidenciar seu pico na noite do 6.º dia de gestação. Ocorre de maneira centrífuga iniciando na parte antimesometrial onde se localizava o embrião, indo de encontro ao miométrio.
- A morte celular que ocorre no epitélio uterino, bem como a que ocorre no estroma endometrial, parece não ter relação alguma com a presença das células

trofoblásticas; é provável que ocorra uma morte programada pelo próprio organismo materno.

- Num primeiro momento, através da análise e discussão do resultados apresentados, conseguimos concluir que o processo de implantação embrionária que ocorre no roedor **Calomys callosus** é do tipo deslocamento, indo de encontro com outros autores já que este é o tipo predominante nos roedores de laboratório.

VI - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

PRANCHA 1: Noite do 5.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 1: Observar: o embrião (**E**) em estágio avançado da implantação, epitélio uterino (**ep**) no fundo da cripta uterina. No embrião notar trofoblasto (**T**), endoderma visceral (**v**) e parietal (**p**), saco vitelino (**s**), cone ectoplacentário (**ce**). Estroma endometrial (**Es**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 200x.

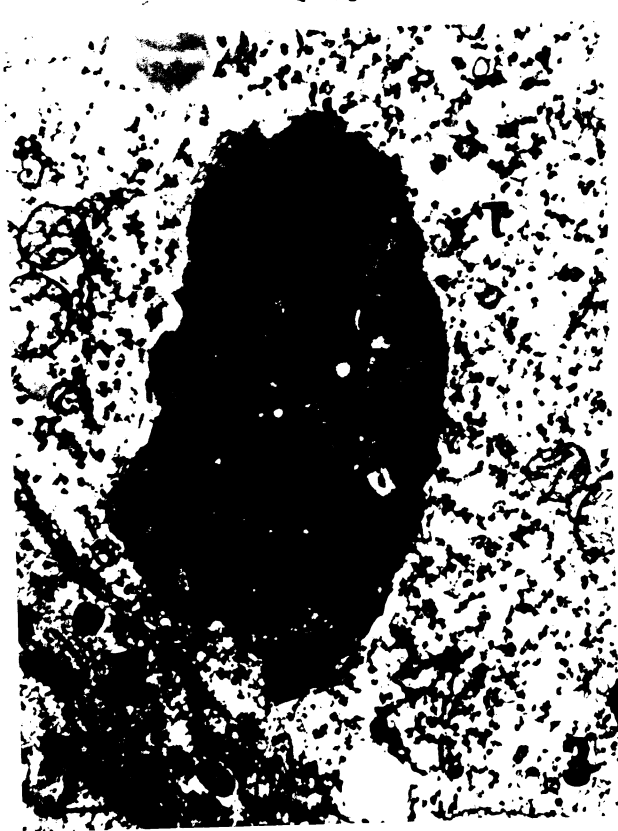
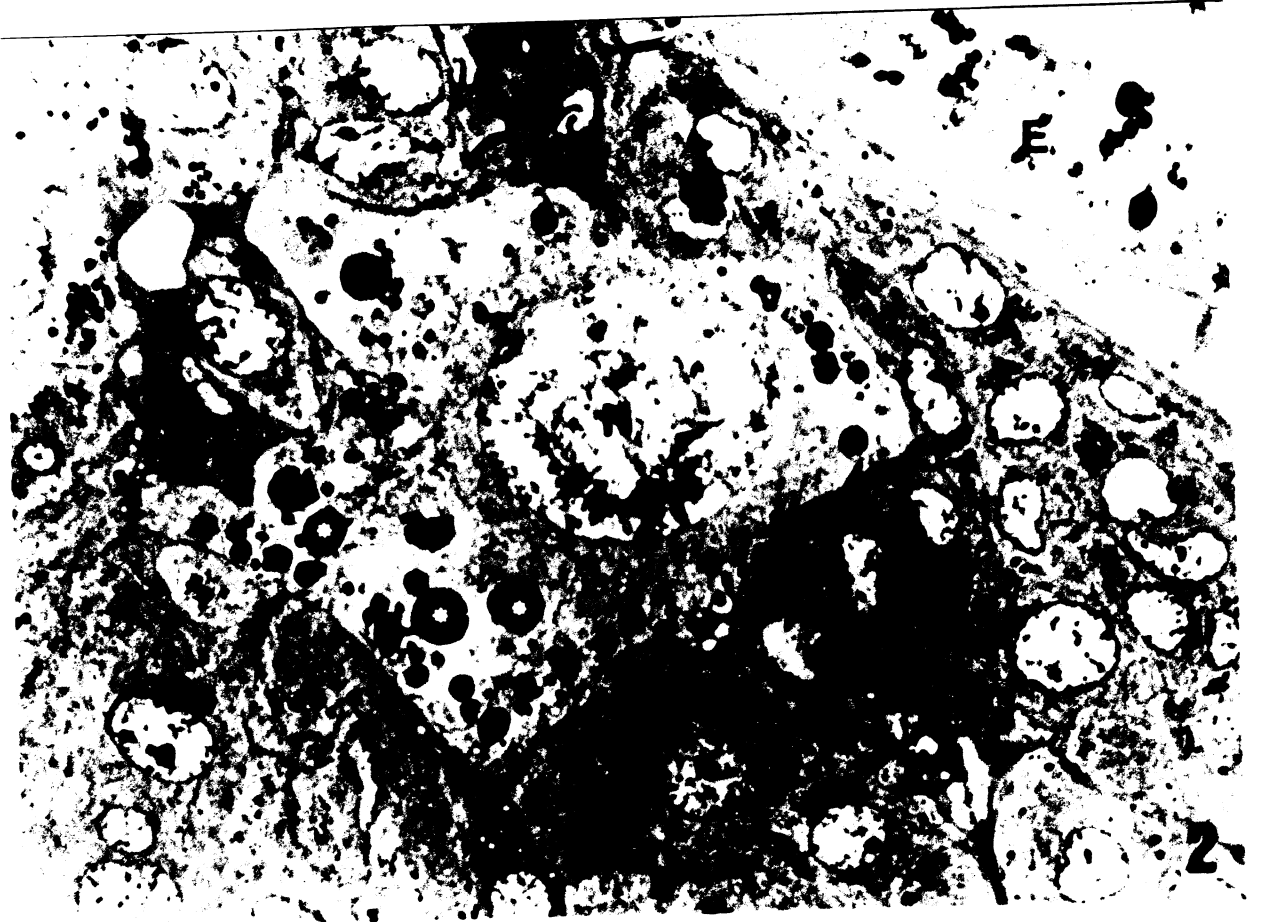


PRANCHA 2: Noite do 5.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 2: Detalhe de uma célula trofoblástica gigante (**T**) próximo ao embrião (**E**). No citoplasma do trofoblasto pontos com maior intensidade cromática (*****) núcleo proeminente (**N**) e nucléolos evidentes (**↑**), rodeando o trofoblasto notar o estroma endometrial (**Es**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 550x.

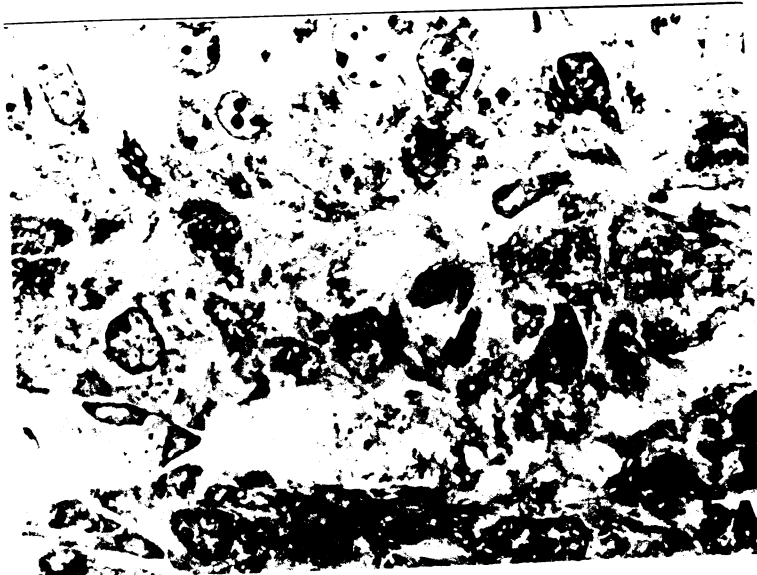
Figura 3: Eletromicrografia do citoplasma da célula trofoblástica (**T**) com uma célula epitelial (**Ep**) aparentemente aprisionada em seu interior. Na parte inferior da figura observar que a célula trofoblástica apoia-se sobre a lâmina basal (**→**). 16500x.

Figura 4: Observar prolongamentos citoplasmáticos da célula trofoblástica (**T**) aparentemente envolvendo (**↑**) uma porção célula decidual (**D**) aparentemente sadia. Eletromicrografia, 5500x.



PRANCHA 3: Noite do 5.º dia de gestação em *Calomys callosus*

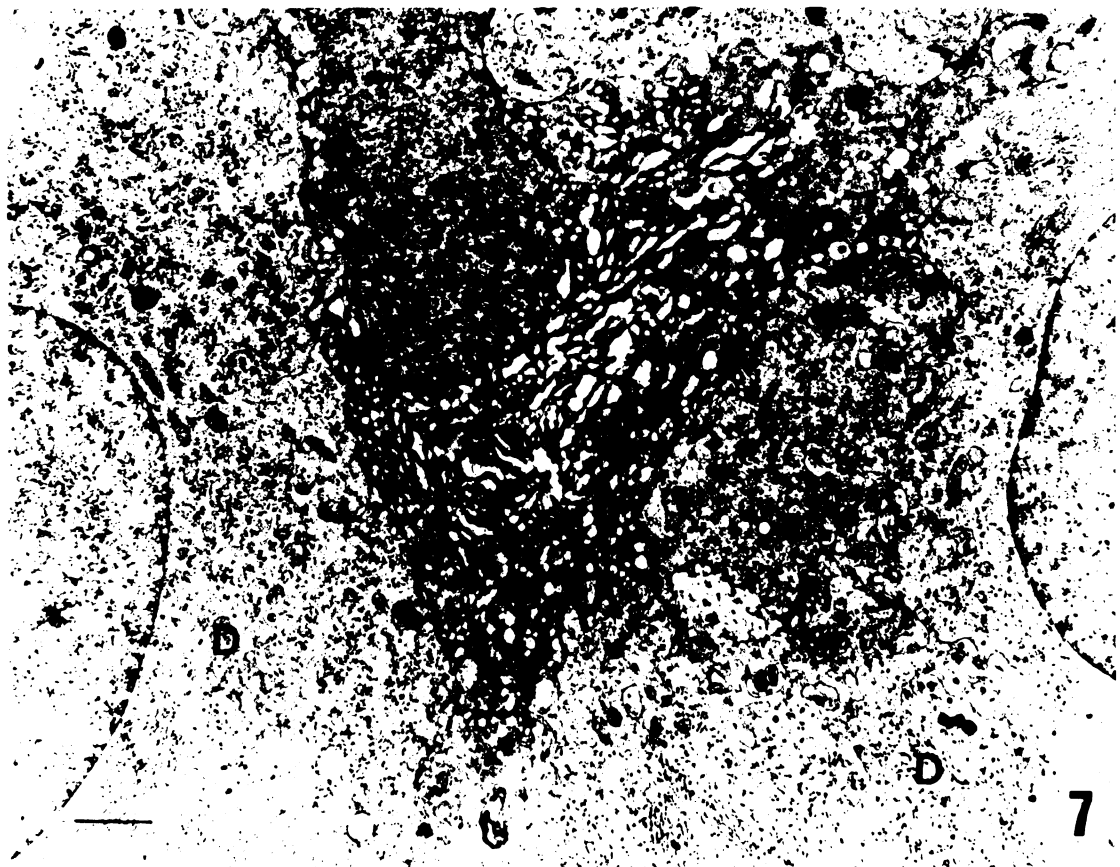
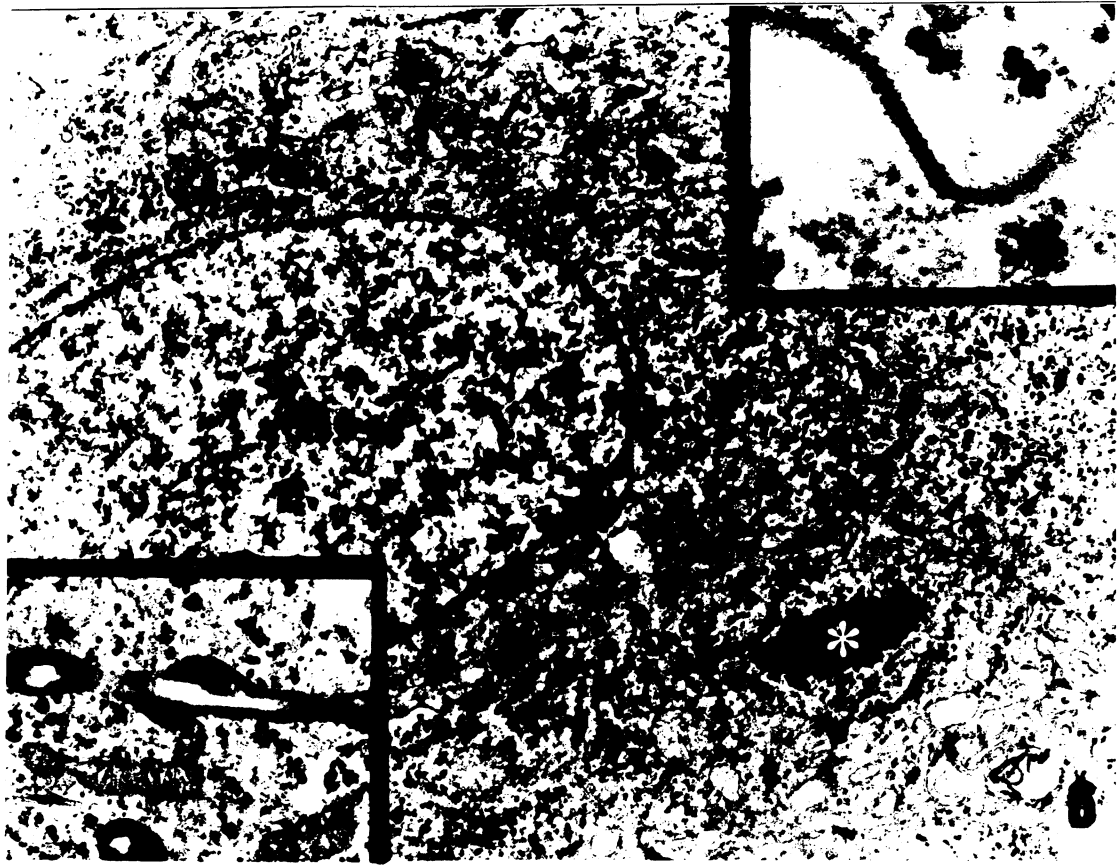
Figuras 5A, 5B e 5C: Observar arranjos celulares do estroma endometrial, na foto **5A** região de decídua compacta próxima ao embrião, **5B** região intermediária com arranjo intermediário da decídua e **5C** próximo ao miométrio arranjo frouxo. Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 350x.



PRANCHA 4: Noite do 5.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 6: Célula decidual com núcleo eucromático (**N**). No citoplasma observar: retículo endoplasmático granular (**Rg**), inúmeros polirribossomos livres (**▲**) e acúmulos de glicogênio (**⊛**). No canto superior direito notar junção **gap**, muito freqüente na decídua; e no canto inferior esquerdo observar vacúolos fagossômicos com fibrilas colágenas em seu interior. Eletromicrografia, 12000x; detalhes (**superior**) 97000x e (**inferior**) 20000x.

Figura 7: Célula decidual (**Dd**) em processo degenerativo em meio a outras aparentemente sadias (**D**). Eletromicrografia, 4800x.



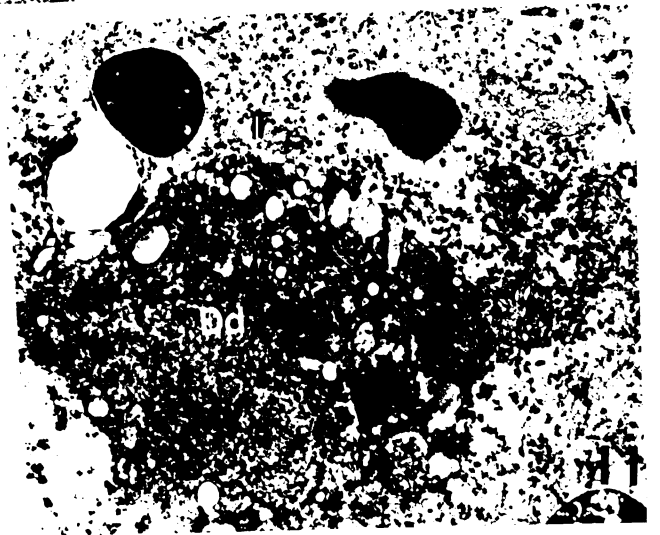
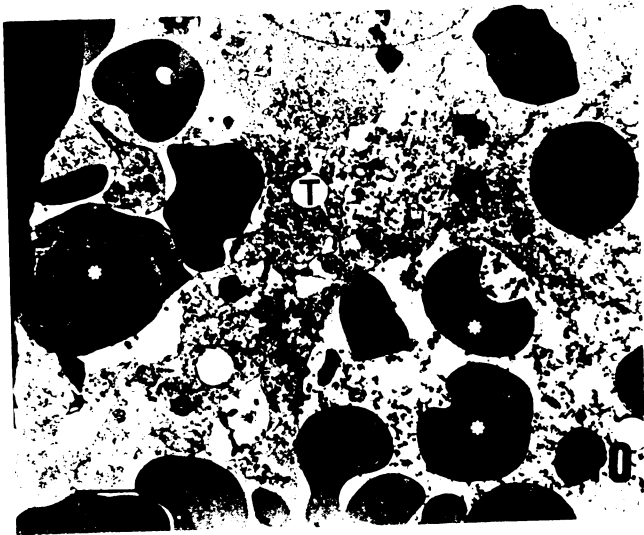
PRANCHA 5: Noite do 5.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 8: Observar célula trofoblástica (**T**) aparentemente deslocando célula epitelial (**Ep**) da lâmina basal (**↘**). Eletromicrografia, 8000x.

Figura 9: Observar um detalhe de um prolongamento citoplasmático da célula trofoblástica (**T**) invadindo células decíduais (**D**). Eletromicrografia, 5000x.

Figura 10: Observar no citoplasma da célula trofoblástica (**T**) células sanguíneas materna (*****) provavelmente fagocitadas por elas. Eletromicrografia, 4000x.

Figura 11: Observar que além de células sanguíneas, células decíduais degeneradas (**Dd**) também foram flagradas aparentemente aprisionadas no citoplasma da célula trofoblástica (**T**). Eletromicrografia, 15000x.



PRANCHA 6: Madrugada do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 12: Observar o embrião (**E**) já com o início da cavidade pró-amniótica (**↑**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 370x.

Figura 13: Observar fibrilas colágenas (*****) nos espaços intercelulares do estroma endometrial (**D**). Eletromicrografia, 15000x.

Figura 14: Detalhe ultra-estrutural de um fino prolongamento citoplasmático da célula trofoblástica (**T**) no espaço intercelular (*****) por entre células decíduais, onde pode-se notar fibrilas colágenas (**↑**). Eletromicrografia, 15000x.

Figura 15: Observar célula trofoblástica (**T**) próxima a um vaso sanguíneo (**V**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 370x.



PRANCHA 7: Madrugada do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 16: Observar o epitélio uterino (**ep**) remanescente na região mesometrial onde algumas células apresentam uma maior intensidade cromática (**◆**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 340x.

Figura 17: Observar o embrião (**E**) com saco vitelino (*****) e cavidade pró-amniótica em desenvolvimento (**↑**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 340x.



16



17

PRANCHA 8: Manhã do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 18: Observar o compacto arranjo das células do estroma endometrial (**Es**), assim com células em mitose (**▲**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 400x.

Figura 19: Interface da célula trofoblástica (**T**) com a célula decidual (**D**). No espaço intercelular observa-se um material elétron-denso (**→**). Eletromicrografia, 5500x.

Figura 20: Célula trofoblástica (**T**) próxima aos vasos sanguíneos materno (**v**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato. Azul de toluidina, 400x.

Figura 21: Citoplasma do trofoblasto (**T**), onde observa-se, leucócitos (**L**), vacúolos elétron-densos (*****) e material elétron-denso em forma de grumos (**↑**). Eletromicrografia, 4400x.



PRANCHA 9: Tarde do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

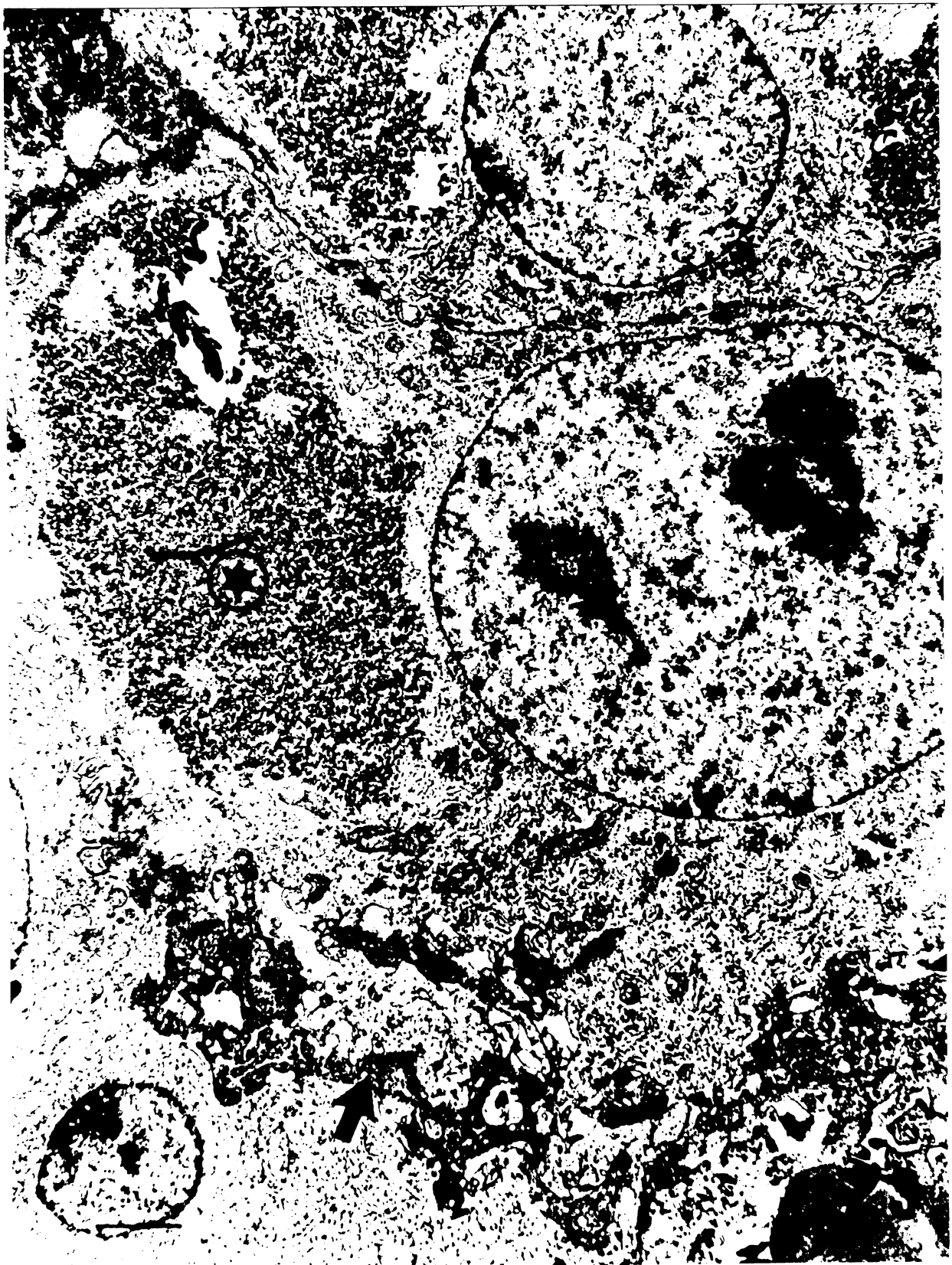
Figura 22: Embrião (**E**) circundado por estroma endometrial (**Es**). Notar que próximo ao embrião as células do estroma apresentam maior intensidade cromática (**✱**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 65x.



—

PRANCHA 10: Tarde do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 23: Ultraestrutura de uma célula decidual onde grandes acúmulos de glicogênio (⊕) são observados no citoplasma e no espaço intercelular material amorfo elétron-denso (➔). Eletromicrografia. 8400x



PRANCHA 11: Noite do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 24: Observar embrião com cavidade pró-amniótica (*) formada, ectoderme (**ec**), endoderme visceral (**v**) e parietal (**p**), delimitando o saco vitelino (**s**). Observar também células trofoblásticas gigantes (**T**), vasos sanguíneos (**v**) e decídua (**D**). Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 180x.

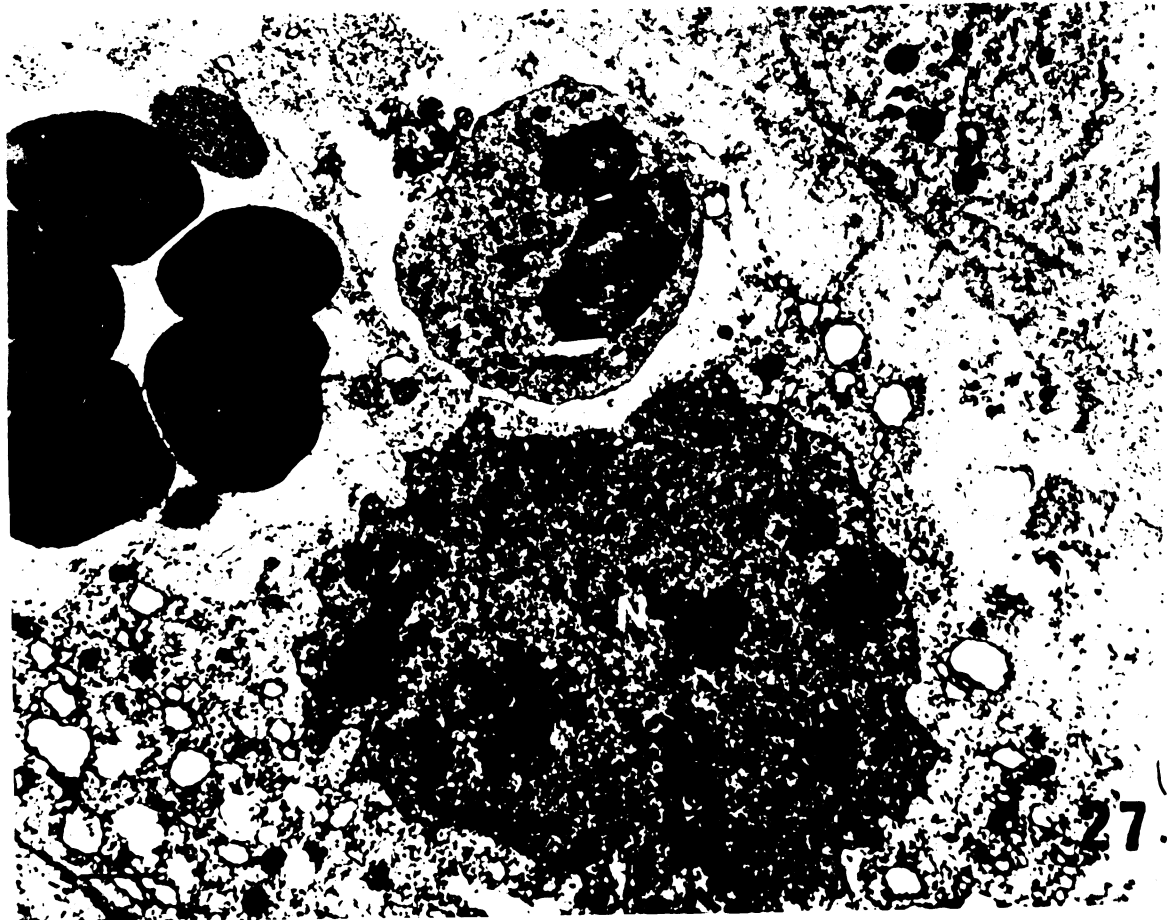


PRANCHA 12: Noite do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 25: Observar que na região mesometrial os vasos sanguíneos (▲) estão mais evidentes. O estroma endometrial (**Es**) apresenta uma total compactação em toda sua extensão. Fotomicrografia, Glicol Metacrilato, Azul de toluidina, 370x.

Figura 26: Interface da célula trofoblástica (**T**) e células deciduais degeneradas (**Dd**), onde esta se apresenta degenerada. Eletromicrografia, 15000x.

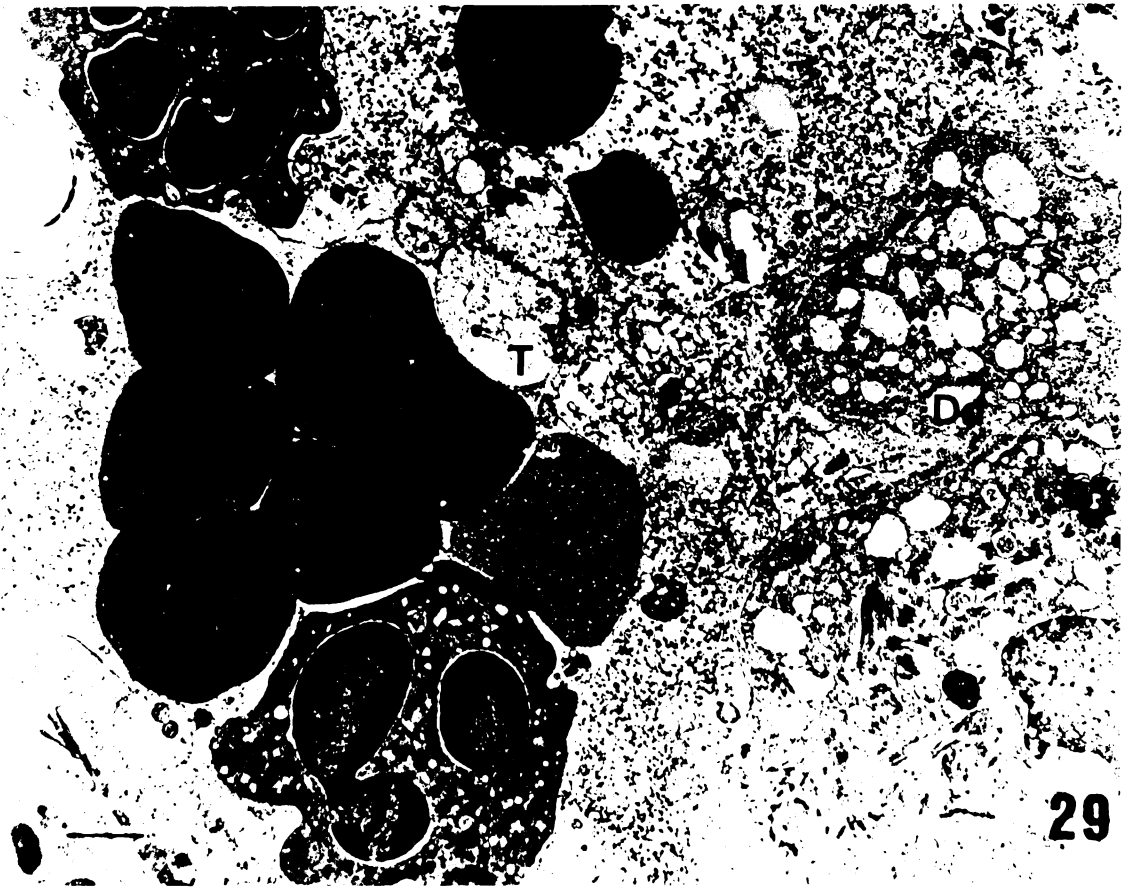
Figura 27: Citoplasma do trofoblasto (**T**) onde visualiza-se células sanguíneas (**S**) aparentemente aprisionadas. Núcleo (**N**) proeminente. Próxima a esta célula observar uma célula decidual (**D**) Eletromicrografia, 7500x.



PRANCHA 13: Noite do 6.º dia de gestação em *Calomys callosus*

Figura 28: Interface entre célula trofoblástica (**T**) e célula decidual (**D**) onde esta apresenta-se aparentemente englobada (→) por prolongamentos citoplasmáticos da célula trofoblástica. Eletromicrografia, 7500x.

Figura 29: Citoplasma da célula trofoblástica (**T**), com células sanguíneas (**S**) e deciduais (**D**) aparentemente aprisionadas no seu interior. Observar célula decidual degenerada (**Dd**) próxima ao trofoblasto. Eletromicrografia, 6000x.



VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAMSOHN, P.A. (1983). *Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua*. **Anat. Embryol.**, **166**:263-274.

ABRAHAMSOHN, P.A. and ZORN, T.M.T. (1993) *Implantation and decidualisation in rodents*. **J. Exp. Zool.** **266**: 603- 628.

ALBERTO- RINCON, M.C., ZORN, T.M.T. and ABRAHAMSOHN, P.A. (1989). *Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometium during decidualization*. **Amer. J. Anat.**, **186**: 417-4

ANDERSON, T.L. and HOFFMAN, L.H.(1984). *Alterations in epithelial glycocalix of rabbit uteri during early pseudopregnancy and pregnancy, and following ovariectomy*. **Amer. J. Anat.** **171**: 321-334.

BEVILACQUA, E.M.A.F. (1984). *Estudo Ultra-estrutural da interação materno embrionária durante o início da gestação de camundongos*. São Paulo, 161 p. [Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

BEVILACQUA, E.M.A.F. and ABRAHAMSOHN, P.A.(1988). *Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of the mouse embryo*. **J. Morphol.**, **198**:341-351.

* Referências formuladas de acordo com normas da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas.

- BEVILACQUA, E.M.A.F. and ABRAHAMSON, P.A. (1989) *Trophoblast invasion during implantation of mouse embryo*. **Arch. Biol. Med. Exp.**, **22**: 107-118.
- BLANKENSHIP, T.N.; GIVEN, R.L. and PARKENING, T.A. (1990) *Blastocyst implantation in the Chinese Hamster (Cricetulus griseus)*. **Am. J. Anat.** **187**: 137-157.
- BOTTE, V., TRAMONTANA, S. and CHIFFI, G. (1968). *Histochemical distribution of some hydroxysteroid dehydrogenases in the placenta, foetal membranes and uterine mucosa of the mouse*. **J. Endocrinol.**, **40**: 189-194.
- CARSON, D.D., WILSON, O.F. and DUTT, A. (1990). *Glycoconjugate expression and interactions at the cell surface of mouse uterine epithelial cells and perimplantation-stage embryos*. In: **Trophoblast invasion and Endometrial Receptivity**. Eds. H.W. Denker & J.D. Aplin. New York, Plenum publishing corporation, p. 211-241.
- CHAVEZ, D.J. & ANDERSON, T.L. (1985). *The glycocalyx uterine luminal epithelium estrus, early pregnancy, the peri-implantation period and delayed implantation*. I. Acquisition of **Ricines communis I** binding sites during pregnancy. **Biol. Reprod.**, **32**: 1135-1142.
- COPP, A.J. (1979). *Interaction between inner cell mass and trophoblast*. II. The fate of the polar trophoblast. **J. Embryo. exp. Morphol.**, **51**: 109-120.
- DZEIADEK, M., FUJIWARA, S., PAULSSON, M. and TEIMPL, R. (1985). *Immunological characterization of basement membrane types heparan sulfate proteoglycan*. **EMBO, J.**, **4**: 905-912.
- ENDERS, A.C. and SCHLAFKE, S. (1967). *A morphological analysis of the early implantation stages in the rat*. **Amer. J. Anat.**, **120**: 185-226
- ENDERS, A.C. and SCHLAFKE, S. (1971) Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. **Amer. J. Anat.**, **132**: 219-240.
- ENDERS, A.C. and SCHLAFKE, S. (1972). *Implantation in the ferret: epithelial penetration*. **Amer. J. Anat.**, **133**: 291-316.
- ENDERS, A.C., HENDRICKX, A.G. and SCHLAFKE, S. (1983). *Implantation in the rhesus monkey: initial penetration of endometrium*. **Amer. J. Anat.**, **167**: 275-298.
- FARACH, M.C., TANG, J.P., DENKER, G.J. and CARSON, D.D. (1987). *Heparin heparan sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos "in vivo"*. **Dev. Biol.** **123**: 401-410.

- FARACH, M.C., TANG, J.P., DENKER, G.J. and CARSON, D.D. (1988). *Differential effects of p-nitrophenyl-D-xylosides on mouse blastocysts and uterine epithelial cells.* **Biol. Reprod.**, **39**: 443- 455.
- FERRO, E.A.V. *Estudo da interface materno embrionária em etapas iniciais da implantação em Calomys callosus.* São Paulo, 1991. [Tese de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- FERRO, E.A V. and BEVILACQUA, E.M.A.F. (1994) *Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in Calomys callosus (Rodentia, Cricetidae).* **Journal of Morphol.** **221**: 139-152.
- FINN, C.A. and McLAREN,A.(1967) *A study of the early stage of implantation in mice.* **J. Reprod. Fertil.** **13**: 259-267.
- HEDLUND, K. and NILSSON, O.(1971) *Hormonal requirimentes for theuterine attachment reaction and blastocyst implantation in the mouse, hamster, guinea- pig.* **J. Reprod. Fert.** **26**: 267-269.
- HEDLUND,K.,NILSSON, O.,REINIUS, S. and AMAN, G. (1972) *Attachment reaction of the hamster, guinea-pig, rabbit and mink.* **J. Reprod. Fert.** **29**: 131-132.
- HERZ, Z., KHAN, I., JAYATILAK, P.G., GIBORI, G.(1985) *Evidence for the syntesis and secretion of decidual luteotropin: a prolactin like hormone produced by rat deciduals cells.* **Endocrinology** **118**: 2203-2209.
- HEWITT, K., BEER, A.E. and GRINELL, F. (1979) *Disappearance of anionic sites from the surface of the rat endometrial epithelium at the time blastocysts implantation.* **Biol. Reprod.** **21**: 691-707.
- HINCHLIFFE, J.R. and EL-SHERSHABY, A.M. (1975) *Epithelial autolysis implantation of the mouse blastocyst an ultrastuctural study.* **J. Embryol. exp. Morph.** **33**: 1067-1080.
- ILGREN, E.B.(1983) Review article: *Control of trophoblast growth.* **Placenta** **4**:307-328.
- JUSTINES, G. and JOHNSON, K.M. (1969) *Imune tolerance in Calomys callosus infected with machupo virus.* **Nature** **222**: 1090-1091.
- KARNOVSKY, M.J. (1965) *A fomaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.* **J. Cell Biol.** **27**: 1374.
- KIRBY, D.R.S.(1965) *The invasive trophoblast.* In: W.W. Park (eds): *The Early Conceptus, Normal and Abnormal.* Livingstone: Edinburgh and London, pp.68-73.

- KREHBIEL, R.H. (1937) *Cytological studies of the decidual reaction in the rat during pregnancy and in the production of deciduomata*. **Physiol. Zool.** **10**:212-238.
- LALA, P. K., KEARMS, M., FARHAR, R.S., SCODRAS, J. and JOHNSON, S. (1986) *Immunological role of the cellular constituents of the decidua in the maintenance of semiallogeneic pregnancy*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **476**: 183-205.
- LARSEN, J.F. (1961) Electron microscopy of the implantation site in the rabbit. **Amer. J. Anat.**, **109**: 319-334.
- MARTIN, L., FINN, C.A., and CARTER, J. (1970) *Effects of progesterone and oestradiol on the luminal epithelium of the mouse uterus*. **J. Reprod. Fert.** **21**:461-169.
- MELLO, D.A. (1977) *Note on breeding of **Calomys expulsus**, Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae) under laboratory condition*. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.** **10(2)**: 107.
- MELLO, D.A. (1978) *Biology of **Calomys callosus** (Renger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae)*. **Rev. Bras. Biol.** **38(4)**: 807-811.
- PARR, M.B.; TUNG, H.N. and PARR, E.L. (1986) *The ultrastructure of the rat primary decidual zone*. **Amer. J. Anat.** **176**: 423-436.
- PSYCHOYOS, A. (1960) *La reaction deciduale at précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l' uterus*. **Comp. Rend. Soc. Biol.** **154**:1384-1387.
- REINIUS, S. (1967) *Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse*. **Z. Zellforsch.** **77**: 257-266.
- RIBEIRO, R.D. (1973) *Novo reservatório do **Tripanossoma cruzi***. **Rev. Bras. Biol.** **33**: 429-437.
- ROSSANT, J. and CROY, B.A. (1985) *Genetic identification of tissue of origin of cellula populations within the mouse placenta*. **J. Embryol. exp. Morphol.** **86**:177-189.
- ROSSANT, J. and TAMURA-LIS, W. (1981) *Effect of culture conditions on diploide giant cell transformation in postimplantation mouse trophoblast*. **J. Embryol. exp. Morphol.** **62**: 217-227.
- SHCLAFKE, S. WELSH, I.O. and ENDERS, A.C. (1985) *Penetration of the basal lamina of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat*. **Anat. Rec.** **212**: 47-56.

- SHCLAFKE, S. and ENDERS, A.C. (1975) *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. **Biol. Reprod.** **12**: 41-65.
- SHERMAN, M.I., SHALGI, R., RIZZINO, A., SELLENS, M.H., GAY, S. and GAY, R. (1979) Changes in the surface of the mouse blastocyst at implantation. In: *Maternal Recognition of Pregnancy*. Ciba Found. Sym. 64, New York, Excerpta Medica, pp.33-52.
- SNELL, G. D. (1941) **"Biology of the laboratory mouse"**. Blakinston, Philadelphia. 479pps.
- SOARES, M.J. and GLASSER, S.R. (1987) *Placental lactogen production and functional differentiation of rat trophoblast cells in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** **79**: 335-341.
- STEER, H.W. (1970) The trophoblastic knobs of the perimplantation rabbit blastocyst: a light and electron microscopic study. **J. Anat.**, **107**: 315-325.
- STEER, H.W. (1971) Implantation of the rabbit blastocyst: the invasive phase. **J. Anat.**, **110**: 445-462.
- WELSH, A.O. and ENDERS, A.C. (1985) *Light and electron microscopic examination of the mature decidua cells of the rat with emphasis of the antimesometrial decidua and its degeneration*. **Am. Anat. J.** **172**: 1-29.
- WELSH, A.O. and ENDERS, A.C. (1987) *Trophoblast-decidual cell interaction and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat*. **Anat. Rec.** **217**: 203-219.
- WIDE, L. and WIDE, (1979) *Chorionic gonadotrophin in the mouse from implantation to term*. **J. Reprod. Fertil.** **57**: 5-9.
- ZORN, T.M.T.; OLIVEIRA, S.F. and ABRAHAMSOHN, P.A. (1990) *Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidua cells*. **J. Struc. Biol.** **103**: 23-33.