

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

ASPECTOS INVASIVOS DO TROFOBLASTO DURANTE O 7º DIA DE
PRENHEZ EM *Calomys callosus* (Renger, 1830).

ALESSANDRA GOMES BEDORE

PROF^a. MS. ELOÍSA AMÁLIA VIEIRA FERRO
PROFESSORA ORIENTADORA

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

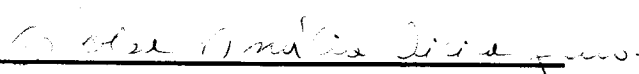
Uberlândia - M. G.
Dezembro - 1995

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

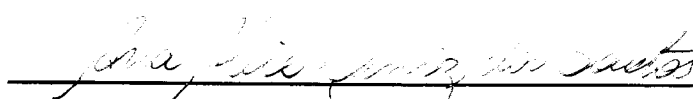
ASPECTOS INVASIVOS DO TROFOBLASTO DURANTE O 7º DIA DE
PRENHEZ EM *Calomys callosus* (Renger, 1830).

ALESSANDRA GOMES BEDORE

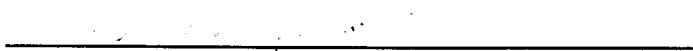
APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 12/12/1995 CONCEITO: 4,000



Profª MS. Eloísa Amália Vieira Ferro
Orientadora



Profª MS. Ana Alice Diniz dos Santos
Conselheira



Profª MS. Paula Dechichi
Conselheira



Profª MS. Nora-Ney Santos Barcelos
Coordenadora do Curso

UBERLÂNDIA - M. G.
DEZEMBRO - 1995

“Cada um de nós tem dentro de si alguma coisa que não pode ser negada, mesmo que nos faça gritar, gritar até o fim. Somos o que somos e pronto. Como a velha lenda celta do pássaro com espinho no peito que canta até morrer. Canta porque precisa fazê-lo, porque é levado a isso. Podemos saber que vamos errar, antes mesmo de cometermos o erro, mas o conhecimento de nós não afeta, nem muda o resultado. Cada qual entoia o seu cantozinho convencido de que é o canto mais maravilhoso que o mundo já ouviu”.

(autor desconhecido)

Aos meus pais

Jorge e Benedicta

pelo exemplo de coragem e perseverança

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A prof^a. Eloísa Amália Vieira Ferro pela amizade, dedicação, orientação inestimável e por me apoiar no início e prosseguimento de minha carreira universitária.

AGRADECIMENTOS

Sou grata:

À Profª. Ana Alice Diniz dos Santos pelo apoio, compreensão e palavras de conforto.

Aos meus irmãos Vanessa e Daniel Gomes Bedore pela dedicação e amor que muito me incentivaram na minha vida acadêmica.

As minhas amigas Eliana, Valéria, Gyovanna e Maria Teresa pela amizade, companheirismo e incentivo.

Ao meu amigo Leandro J. Mostério por me ensinar que nunca deve se desistir de um sonho.

Aos meus tios João Luís e Eliziária Ferreira pela ajuda, solidariedade e preocupação.

Ao Sr. Hégio Heinisch Werneck, que tanto colaborou para a confecção dessa monografia.

Ao Prof. Nelson Rui R. Bejarano pelo incentivo e compreensão.

ÍNDICE:

I - Introdução.....	1
1.1 - Invasão do epitélio uterino.....	4
1.1.1 - Intrusão.....	5
1.1.2 - Deslocamento.....	5
1.1.3 - Fusão.....	6
1.2 - Trofoblasto.....	7
1.3 - Mudanças ocorridas no Estroma endometrial.....	8
1.4 - <i>Calomys callosus</i>	10
1.5 - Aspectos iniciais da implantação em <i>Calomys callosus</i>	11
II - Objetivos.....	14
III - Materiais e Métodos.....	15
3.1 - Espécimes.....	15
3.2 - Acasalamento.....	16
3.3 - Coleta e processamento do material.....	16
3.4 - Fixação e processamento do material para Microscopia de Luz.....	17
IV - Resultados.....	18
4.1 - 7º dia madrugada de gestação.....	18
4.1.1 - Embrião.....	18

4.1.2 - Mucosa uterina.....	19
4.1.3 - Interação trofoblasto - decídua.....	21
4.2 - 7º dia manhã de gestação.....	22
4.2.1 - Embrião.....	22
4.2.2 - Mucosa uterina.....	23
4.2.3 - Interação trofoblasto - decídua.....	24
4.3 - 7º dia tarde de gestação.....	25
4.3.1 - Embrião.....	25
4.3.2 - Mucosa uterina.....	25
4.3.3 - Interação trofoblasto - decídua.....	27
4.4 - 7º dia noite de gestação.....	28
4.4.1 - Embrião.....	28
4.4.2 - Mucosa uterina.....	29
4.4.3 - Interação trofoblasto - decídua.....	30
V - Discussão.....	31
5.1 - Embrião.....	32
5.2 - Estroma Endometrial.....	33
5.3 - Interação trofoblasto - decídua.....	35
VI - Conclusões.....	39
VII - Documentação fotográfica.....	42
VIII - Referências bibliográficas.....	57

RESUMO:

Este trabalho procurou focalizar a sequência de eventos envolvidos na invasão do estroma uterino de *Calomys callosus* pela células trofoblásticas, assim como a morfologia dos componentes celulares envolvidos. O trofoblasto é um tipo celular envolvido com a implantação do embrião ao útero e a formação da parte fetal da placenta. Em etapas que precedem a formação da placenta são as células trofoblásticas responsáveis pela nutrição do embrião. As fêmeas utilizadas no experimento foram acasaladas e a constatação deste foi feita através da presença de rolha vaginal. O 1º dia de gestação foi considerado aquele em cuja manhã se observou a rolha vaginal. As coletas de material foram feitas em quatro horários diferentes do 7º dia de gestação, visando-se flagrar o maior número possível de etapas do processo de desenvolvimento embrionário. Posteriormente a coleta, esse material foi desidratado em álcoois de concentrações crescentes e incluídos em Glicol metacrilato para observação em Microscopia de Luz. Na madrugada do 7º dia de gestação, o embrião caracterizou-se morfologicamente por apresentar: externamente o trofectoderma e internamente o endoderma (visceral e parietal), o ectoderma (embrionário e extra-embriônico) e a cavidade pró-amniótica. Um início de mesoderma foi observado, apesar de suas células se assemelharem muito as células endodérmicas. Basicamente duas populações celulares de trofoblastos foram notadas: as células trofoblásticas achatadas ao redor do embrião (trofectoderma) e as células trofoblásticas gigantes secundárias na região do cone ectoplacentário. Na manhã do 7º dia de gestação, as células do mesoderma

tornaram-se mais visíveis e dispunham-se num arranjo irregular com maior espaço extra-celular. No citoplasma das células trofoblásticas da região do cone foram encontrados prováveis vacúolos de fagocitose de hemáceas e um consequente aumento na frequência de acúmulos de pigmentos de hemossiderina. Nas duas fases que se seguem, tarde e noite do 7º dia de gestação, ocorreu um progressivo avanço da rede trofoblástica em direção ao mesométrio uterino. As células trofoblásticas de *Calomys callosus* manifestaram-se muito mais agressivas e invasivas do que o observado em outros roedores. Como consequência, observaram-se uma maior incidência de vasos sanguíneos rompidos e fagocitoses de células sanguíneas pelas células trofoblásticas. Quanto ao embrião, na tarde do 7º dia, foi observada uma nova cavidade resultante de uma cavitação do mesoderma, o exoceloma. De um consequente crescimento do exoceloma em direção a cavidade pró-amniótica deriva a formação de três cavidades internas ao embrião: a cavidade amniótica, o exoceloma propriamente dito e a cavidade ectoplacentária. Essas três cavidades ocuparam o que correspondia a antiga cavidade pró-amniótica. De modo geral, notou-se um aumento de acúmulos PAS positivos nas células decíduais da região mediana do estroma uterino durante o desenvolvimento embrionário estudado. Estes vacúolos PAS positivos estavam diretamente relacionados com a reserva de glicogênio nessa área. Tanto o aumento na incidência de vasos sanguíneos quanto a maior quantidade de depósitos de glicogênio relacionam-se com a formação da parte materna da placenta. Em consequência, uma maior concentração de nutrientes nessa região é justificada.

I - INTRODUÇÃO

Implantação embrionária corresponde a uma série de eventos que ocorrem a partir do momento em que o embrião não é mais livre para ser deslocado no interior do útero.

Em todos os mamíferos no momento da implantação, o embrião se encontra no estágio de blastocisto. Nesta fase podem ser reconhecidos duas classes celulares: a) massa celular interna ou embrioblasto, um conjunto compacto de células, que acumula em um dos pólos do blastocisto e b) o trofoblasto, formado por um conjunto de células que revestem a massa celular interna e a blastocele (Ferro, 1991).

O trofoblasto pode ser regionalmente dividido em três tipos: trofoblasto mural, abembrionário e polar. O trofoblasto mural corresponde ao localizado nas paredes laterais embrionárias, o trofoblasto polar é aquele que circunda a massa celular interna, já o trofoblasto abembrionário corresponde ao localizado no pólo oposto ao da massa celular interna (Ferro, 1991).

Existem variações na forma do embrião se fixar ao útero: em hamster (Hedlund et alii, 1972; Nilsson, 1967; Blankenship et alii, 1990), camundongo (Hedlund et alii, 1972; Nilsson, 1967), ratos (Hedlund et alii, 1972) e *Calomys* (Ferro et al., 1994) é excêntrica; em coelho (Hedlund et alii, 1972) é central e em cobaias e primatas (Hedlund et alii, 1972) é intersticial.

Independente do grau de intimidade que possa vir a existir entre o organismo materno e embrionário, este processo sempre envolve pelo menos duas fases iniciais, comuns a todas as espécies: as fases de aposição e adesão, onde o trofoblasto e o epitélio interagem diretamente.

A fase de aposição é caracterizada pelo estabelecimento gradativo de um contato entre o organismo materno e embrionário. E este contato tende a ser progressivamente mais complexo conforme avança a aproximação entre epitélio uterino e trofoblasto.

Diversos autores tentam explicar como ocorre a aproximação entre o embrião e o endométrio. Enders & Schlafke (1967) observaram em camundongos e ratos um estreitamento do lúmen uterino ao redor do embrião, onde ocorria então um aparente abraçamento (envolvimento) do blastocisto pelo útero. O mesmo foi também observado em hamster (Blankenship et alii, 1990; Enders, 1972).

Por outro lado, em vison e macaco Rhesus (Hedlund et alii, 1972) , em coelho (Hedlund et alii, 1972) o que se observa é uma expansão do blastocisto preenchendo o lúmen uterino. Neste caso o blastocisto é que parece mediar a aproximação com o epitélio uterino. Independente do mecanismo que desencadeia a aproximação entre organismo materno e embrionário, a associação entre os indivíduos se caracteriza por apresentar fases morfológicamente distintas: aposição, adesão e em algumas espécies a invasão dos tecidos maternos por células embrionárias.

A aposição caracteriza-se por apresentar apenas uma aproximação física entre organismo embrionário e organismo materno. Não há o envolvimento de nenhuma molécula de adesão. Nesta fase o embrião pode ser deslocado do útero por uma simples lavagem da luz (Ferro,1991).

A progressiva interdigitação entre os microvilos do trofoblasto e epitélio uterino e consequente aumento na associação entre suas membranas, caracterizam a evolução da fase de aposição. Além dessas características outras modificações ainda foram descritas: os microvilos tornam-se mais curtos e irregulares (Nilsson,1966, 1967) e, principalmente na superfície das células epiteliais antimesometriais, podem ser notadas grandes projeções bulbosas citoplasmáticas (Ferro, 1991).

A fase de adesão é caracterizada por uma obliteração do lúmen uterino com associação cada vez mais íntima do epitélio com o trofoblasto (Nilsson, 1966). Nesta fase, extensas áreas de membranas das células trofoblásticas mantêm estreita proximidade com as membranas apicais das células epiteliais. Em algumas espécies, como em ratos, junções foram descritas entre estas células (Enders & Schlafke, 1967).

Apesar de até o momento as bases moleculares do processo de adesão entre trofoblasto e epitélio uterino durante a implantação não serem conhecidas, alguns pesquisadores têm realizados estudos visando caracterizar as moléculas envolvidas no processo.

Chavez & Anderson (1985) com o auxílio de lectinas, uma proteína que se liga a carboidratos, demonstraram a presença de d-galactose no epitélio durante a implantação, e acreditam que esta molécula desempenha o papel de mediadora na adesão entre trofoblasto e epitélio uterino.

Uma redução na espessura do glicocálix do epitélio uterino foi demonstrada ainda por vários autores durante o processo de implantação embrionária. Contudo ressalta-se que aparentemente estas alterações podem não depender da presença do blastocisto (Ferro,1991). No entanto, no caso de furão, a redução do glicocálix se processa devido a uma possível participação embrionária na modificação da superfície epitelial (Enders et al,1972). Assim, o processo de adesão é favorecido com a exposição de sítios de ligação, em virtude da diminuição da espessura do glicocálix.

Hakansson & Sundkvist (1975) demonstraram modificações moleculares da superfície externa do trofoblasto. Segundo eles há uma sensível redução de antígenos de histocompatibilidade (H2) durante a aposição em camundongos. Farach et alii (1987) demonstraram a presença de glicosaminoglicana heparan-sulfato na superfície de blastocistos e o conseqüente aumento desta molécula durante a fase de aposição, indicando uma possível participação desta molécula no processo de adesão.

1.1) INVASÃO DO EPITÉLIO UTERINO:

Ocorrida a adesão do embrião ao epitélio uterino, inicia-se o processo de invasão deste. Este processo é variado e característico a determinados grupos de animais. De modo geral, segundo Schlafke e Enders (1975) os três mecanismos básicos adotados pelo embrião para iniciar esse processo são: **intrusão, deslocamento e fusão.**

1.1.1) Intrusão

Por meio deste mecanismo, prolongamentos trofoblásticos penetram por entre as células epiteliais, rompendo seus complexos unitivos (por um processo desconhecido) e alcançam a lâmina basal, onde mais tarde acaba ocasionando a sua ruptura. Esse tipo de invasão do epitélio uterino ocorre após o trofoblasto ter se aderido ao epitélio uterino e é observado em furão (Enders & Schlafke, 1972).

1.1.2) Deslocamento

Este tipo de invasão é encontrado em ratos, camundongos (Enders & Schlafke, 1967; Schlafke et al, 1975; Enders, 1972) e Calomys (Oliveira e Ferro, comunicação pessoal), sinais indicativos de degeneração nas células epiteliais surgem conforme se processa a adesão embrionária. Estas células quando vistas ao Microscópio de Luz aparecem como massas escuras, isoladas da lâmina basal ou em grupos. As principais alterações encontradas são: retração e fragmentação celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, contudo as suas organelas citoplasmáticas permanecem intactas. Este processo de morte celular é conhecido por apoptose. Estas células muitas vezes são fagocitadas pelo trofoblasto que se utiliza de prolongamentos capazes de englobá-las e fagocitá-las. Desta forma o trofoblasto abre espaço por entre as células epiteliais apoptóticas e alcança a lâmina basal. Uma vez em contato com a lâmina basal, emitem prolongamentos que se insinuam sob a lâmina basal e células epiteliais íntegras e, por fim desloca a célula de sua lâmina basal e a fagocita.

Em ratos, a invasão da lâmina basal ocorre aparentemente por ação das células decíduais (Schlafke et alii, 1985) enquanto que em camundongos (Bevilacqua et al, 1989) e em *Calomys* (Ferro et al, 1994) ocorre por ação das células trofoblásticas. Em de ratos, camundongos e *Calomys* a degeneração epitelial constitui um pré-requisito para que ocorra a invasão do epitélio pelo trofoblasto (Ferro, 1991; Enders et al, 1972).

1.1.3) Fusão

Este tipo de invasão do epitélio uterino é encontrado em coelhos (Enders et al, 1972) onde a intervalos regulares, ocorre a fusão do sinciciotrofoblasto com a superfície apical da membrana plasmática de células epiteliais. Apesar de células epiteliais vizinhas continuarem compartilhando junções intercelulares, na região de contato com o sinciciotrofoblasto as células epiteliais mantêm seus citoplasmas continuos com o do mesmo.

Com o avanço desse processo, observam-se a presença de simplasmas epiteliais formado pela fusão de membranas laterais de células epiteliais, que não fusionaram ao trofoblasto, juntamente com células epiteliais fusionadas com o sinciciotrofoblasto (Ferro, 1991).

O trofoblasto emite prolongamentos, que rompem a lâmina basal , invadem o estroma endometrial e atingem os vasos sangüíneos maternos.

I.2) TROFOBLASTO:

A implantação embrionária em roedores e primatas está associada com a penetração do epitélio uterino pelo trofoblasto (Bevilacqua et al, 1988). Nestes animais, além de propiciar o alojamento do embrião no estroma endometrial, as células trofoblásticas são as principais responsáveis pela nutrição do embrião através de fagocitose celular e absorção de metabólicos do sangue materno, antes do estabelecimento da placenta (Ferro, 1991).

O trofoblasto pode ser celular, sincicial ou uma combinação de ambos; ou ainda, perder sua individualidade através de fusão com células epiteliais uterinas. Embora com padrões variados entre as espécies, o trofoblasto pode ainda secretar hormônios proteicos e esteróides. Possui uma capacidade invasiva e pode ainda se tornar altamente fagocítico (Ferro et al, 1994).

No pólo embrionário do embrião de roedores, as células trofodérmicas diferenciam-se em uma extensa população de células trofoblásticas que estão envolvidas com a formação do cone ectoplacentário (Bevilacqua et al, 1988). Ao contrário da espécie humana, o processo de implantação em roedores se inicia através do trofoblasto mural e abembrionário (Ferro, 1991). Em camundongos, ratos e *Calomys*, células trofoblásticas, especialmente aquelas da parede lateral embrionária, são as primeiras células embrionárias a estabelecer contato com as células maternas e são responsáveis pela invasão inicial do endométrio (Enders, 1972; Bevilacqua et al, 1988; Ferro et al, 1994).

As células trofoblásticas gigantes são originárias de células inicialmente achatadas que revestem a blastocele e suas características são a aquisição de

capacidade invasiva e fagocítica (Ilgren, 1983; Bevilacqua et al, 1988). O aumento da atividade fagocitária nas células trofoblásticas gigantes é indicado pelo acúmulo de vacúolos lisossômicos (Bevilacqua et al, 1988).

Em hamster chinês a membrana das células trofoblásticas em contato com o epitélio uterino exibe microvilos irregulares e um contorno sinuoso que usualmente acompanha a superfície apical do epitélio. Já em *Calomys* a superfície do trofoblasto em contato com o epitélio uterino é preferencialmente lisa (Ferro, 1991).

1.3) MUDANÇAS OCORRIDAS NO ESTROMA ENDOMETRIAL:

Em útero virgem ou naqueles em que ainda não ocorreu a implantação, a maior parte das células do estroma caracterizam-se por ser fusiformes e rodeadas de abundante matriz extracelular. O citoplasma é relativamente pequeno, enquanto o núcleo apresenta contorno irregular, cromatina frouxa e nucléolo proeminente (Ferro, 1991).

Na proximidade imediata da área de implantação do blastocisto, o estroma uterino sofre um complexo e contínuo processo de alteração denominado resposta ou reação decidual. Esta resposta envolve a hiperplasia do estroma que de forma centrífuga adquire um arranjo epitelóide. (Welsh, 1985).

A região antimesometrial é a primeira região do útero a sofrer decidualização, enquanto que a região mesometrial acaba por sofrer decidualização mais tardiamente e desempenha importante função na formação da parte materna da placenta (Ferro, 1991).

Células deciduais em desenvolvimento exibem um citoplasma rico em organelas tais como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e lisossomos, apresentam

gotículas de lipídeos, glicogênio e numerosas junções intercelulares (Blankenship et alii, 1990); o núcleo é de cromatina frouxa, nucléolos evidentes, poliploidia, reduzido espaço intercelular e os contatos intercelulares se dão através de junções do tipo **gap** e **adherens** (Reinius, 1967; Abrahamsohn, 1983). Uma das mais marcantes alterações que podem ser observadas é o aparecimento de fibrilas colágenas espessadas na matriz extracelular (Alberto-Rincon et alii, 1989).

Alguns pesquisadores demonstraram que úteros devidamente tratados com hormônios podem desenvolver um diciduoma, morfologicamente semelhante a decidua (Hedlund et al, 1971).

Entretanto outros fatores, além de hormonais, podem levar o útero a desenvolver uma resposta decidual como por exemplo: o ar, óleo de araquis, histamina, soro fisiológico injetado na luz uterina ou mesmo trauma mecânico e corrente elétrica aplicados ao útero (Ferro, 1991).

Ainda se desconhece o exato mecanismo desenvolvido pelo blastocisto e sua real participação no processo de decidualização durante uma gestação normal.

Diversos eventos, tais como a nutrição do embrião e seu controle invasivo dependem da interação entre embrião e decidua (Bevilacqua et alii, 1985).

Outras funções têm ainda sido proposta à ação da célula decidual como: 1) barreira física à invasão do trofoblasto (Bevilacqua et al,1989), 2) barreira imunológica que funciona para prevenir a rejeição do embrião (Ferro, 1991), 3) produção de hormônios (Hertz et alii, 1985), 4) papel físico no apoio do desenvolvimento embrionário e remodelação da área de implantação no processo de embriogênese (Ferro, 1991).

1.4) *Calomys callosus*:

A superfamília Muroidea abriga grande número de espécies que habitam todo o mundo. Incluídos nesta super-família temos as famílias Cricetidae, à qual pertencem os hamsters, voles e *Calomys*, e Muridae, que incluem os ratos e camundongos (Ferro, 1991). Muitos roedores da família Cricetidae tem sido mantidos em condições laboratoriais.

O gênero *Calomys* habita a América do Sul e Central. Ocorre em distintos tipos de biomas: florestas tropicais, borda de mata, savana, caatinga, pastagens e habitações humanas.

Duas espécies deste gênero: *C. laucha* e *C. callosus*, ocorrem no sul, nordeste e partes central do Brasil (Mello, 1978).

Do ponto de vista epidemiológico, a espécie *Calomys callosus* é considerada como reservatório de *Trypanosoma cruzi* (o agente etiológico da doença de Chagas; Ribeiro, 1973); de *Yersinia pestis* (causador da peste bubônica; Almeida, 1973); e reservatório do vírus Machupo, causador da febre hemorrágica argentina (Justines et al, 1969).

Calomys callosus é um roedor poliétrico, com estro pós-parto, ciclo estral de aproximadamente seis dias e período gestacional de cerca de 22 dias (Mello, 1978). É um animal de fácil adaptação em laboratório, devido a sua fácil reprodução e manutenção.

As fases iniciais de implantação foram amplamente demonstradas por Ferro (1991) e Ferro e Bevilacqua (1994).

1.5) Aspectos iniciais da Implantação em *Calomys callosus* segundo

Ferro(1991):

Ferro em trabalho inédito, estabeleceu que o embrião de *Calomys callosus* se fixa a parede uterina por volta do quarto dia de gestação, fato este que ocorre muito mais precoce do que o observado em outros roedores.

Na manhã do 4º dia de gestação, as células epiteliais apresentam ainda aspectos morfológicos de células sadias, apesar de serem observadas isoladamente algumas células com padrão morfológico alterado. Devido as suas características, estas células acabam lembrando células em processo de degeneração.

Acredita-se que o processo de morte celular pode ser induzido, acidental ou mesmo programado geneticamente. De uma maneira geral, a morte celular tem sido classificada de duas formas: por necrose ou por apoptose.

Uma célula em processo de necrose apresenta perda de suas funções de síntese, edema mitocondrial e rompimento da membrana celular. Este processo é tido como um evento patológico.

O processo de morte celular por apoptose por sua vez, é considerado como não-patológico e envolve os seguintes eventos:

- a) picnose e fragmentação nuclear

- b) diminuição do volume e condensação celular
- c) fragmentação celular sob a forma de corpos apoptóticos e
- d) manutenção das organelas citoplasmáticas intactas e bem preservadas.

Nas células epiteliais de *Calomys callosus*, nem todos os eventos citados acima são observados em todas as células em degeneração. Observa-se a presença de células mortas por apoptose, células mortas por necrose e outras que não se enquadram em nenhuma dessas definições.

Prolongamentos trofoblasticos insinuam-se por entre as células epiteliais degeneradas, deslocando-as de suas lâmina basal. Estes prolongamentos posteriormente ocasionam o rompimento da lâmina basal e permitem o avanço desses em direção ao estroma endometrial, além de deslocar células epiteliais íntegras de sua lâmina basal. Este padrão de implanração caracteriza-se como deslocamento e foi estabelecido recentemente (Oliveira e Ferro, comunicação pessoal).

O estroma endometrial responde ao processo de implantação embrionária com a decidualização de suas células. Estas ganham um aspecto epitelióide, assumem grandes dimensões, tornam-se poliplóides, alteram qualitativa e quantitativamente seu conteúdo organelar, acumulam glicogênio e lípidos em seus citoplasmas e desenvolvem extensos contatos intercelulares através de complexos juncionais. O processo de decidualização em *Calomys* ocorre, semelhante a outros roedores, centrifugamente em direção ao miométrio uterino. Na manhã do 4º dia de gestação, já podem ser vistos sinais de decidualização.

O acúmulo de glicogênio é observado nas células deciduais a partir da madrugada do 5º dia e aumenta consideravelmente com o decorrer do desenvolvimento embrionário.

As células decíduais encontradas ao redor do trofoblasto apresentam-se íntegras, apesar de esporadicamente aparecer isoladamente células decíduais em degeneração.

A invasão da decídua pelo trofoblasto não é impedida pelo fato desta apresentar um arranjo compacto, íntegro e complexo sistema de junções intercelulares.

Com a invasão do estroma endometrial pelo trofoblasto, prolongamentos atingem os vasos sanguíneos maternos, garantindo a nutrição do embrião em etapas que precedem a formação da placenta.

II - OBJETIVOS:

Visando descrever fases mais adiantadas do processo de interação entre trofoblasto e decídua objetiva-se:

- 2.1) Analisar o processo de invasão do estroma endometrial pelo trofoblasto;
- 2.2) Flagrar a interação do trofoblasto com vasos e com células deciduais;
- 2.3) Analisar e descrever as mudanças estruturais observadas no embrião;
- 2.4) Descrever alterações encontradas na decídua.

III - MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1) Espécimes:

Calomys callosus usados neste experimento foram cedidos pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e trazidos para a Universidade Federal de Uberlândia em 1992.

Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Citologia, Histologia e Embriologia, com dieta "ad libitum" de água e ração granulada, complementada com semente de girassol e milho , com 12 horas de luz e 12 horas de escuro e utilizados ao atingir a idade de três meses.

3.2) Acasalamento:

O acasalamento deu-se na proporção de duas fêmeas virgens para cada macho. As fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos por volta das 18 horas de cada segunda-feira. O acasalamento foi detectado pela presença de rolha vaginal. Considerou-se o primeiro dia de gestação, aquele cuja manhã observou-se a presença da rolha vaginal.

3.3) Coleta e Processamento do material:

Com o intuito de flagrar o maior número possível de etapas do processo de desenvolvimento embrionário e interações celulares, foram realizadas coletas, de acordo com o seguinte esquema:

Dia de gestação	Horário da coleta	Número de animais
7.º dia de gestação	2:00 hs # 4:00 hs	2 fêmeas
7.º dia de gestação	8:00 hs # 11:00 hs	2 fêmeas
7.º dia de gestação	14:00 hs # 17:00 hs	2 fêmeas
7.º dia de gestação	20:00 hs # 23:00 hs	2 fêmeas

O material colhido em cada período citado, foi submetido ao processamento para observação em Microscópio de Luz.

3.4) Fixação e Processamento do material para a Microscopia de Luz:

Os animais foram anestesiados por inalação com éter. Após laparotomia, os cornos uterinos foram retirados do corpo do animal, mantidos em placa de cera contendo solução fixadora, onde foram dissecados e recortados transversalmente em relação ao seu maior eixo.

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 aproximadamente.

Após a fixação, seguiu-se a desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 50 a 100%), em seguida, os materiais foram pré-infiltrados em uma mistura 1:1 de glicol metacrilato¹ e etanol absoluto por 18 horas, sendo posteriormente imersos em solução infiltradora² por 24 horas e incluídos em uma mistura³ de resina a temperatura ambiente.

Foram feitos cortes de 2,5 µm de espessura corados pela técnica de hematoxilina e eosina; pelo azul de toluidina a 0,25%; pela técnica de azul de metileno, Azur II e Fucsina básica e pela técnica de PAS (Mc Manus, 1948).

¹ Resina Glicol Metacrilato Historesin, LKB 2218-599, Sweden

² Solução infiltradora: 50 ml de resina básica (Glicol Metacrilato)
5 ml de ativador (peróxido de benzoila)

³ 15 ml de solução infiltradora e 1 ml de endurecedor (derivado de ácido barbitúrio-DMSO-).

IV - RESULTADOS

4.1) 7º dia madrugada

4.1.1 - Embrião:

Nesta fase, o embrião encontrava-se banhado por sangue materno extravasado e caracterizava-se morfológicamente por possuir: externamente o trofotoderma e internamente a cavidade pró-amniótica. Na região mesometrial as células trofoblásticas acumulavam-se e constituía o cone ectoplacentário (fig. 1). As células do cone caracterizavam-se por possuir células trofoblásticas achatadas arranjadas na forma de rede com núcleos amplos e nucléolos evidentes.

Exceto na região do cone, entre a rede trofoblástica e o embrião propriamente dito, existiam células sanguíneas maternas; o embrião apresentava ainda duas cavidades: a mais externa conhecida como saco vitelínico, delimitada pelo endoderma parietal e

endoderma visceral. A segunda cavidade é a cavidade pró-amniótica, revestida por ectoderma (fig. 1).

O ectoderma dividia-se em dois tipos celulares: ectoderma embrionário e ectoderma extra-embrionário. O ectoderma embrionário localizava-se na região mais antimesometrial, enquanto que o extra-embrionário na região mesometrial e comunicava-se com o cone ectoplacentário (fig. 1).

O início de mesoderma foi encontrado se interpondo entre o ectoderma e o endoderma. Estas células ainda não assumiram as características típicas de um mesoderma e assemelhavam-se às células do endoderma.

Intensa atividade mitótica foi observada em todos os tipos celulares, principalmente no ectoderma embrionário (detalhe da figura nº 1).

4.1.2) Mucosa uterina:

Decídua:

As células do estroma endometrial caracterizavam-se por apresentar um arranjo epitelióide com poucos espaços intercelulares. No citoplasma existia amplas regiões que não se coraram pelo azul de toluidina ou fucsina básica e Azur II. Os núcleos eram de cromatina frouxa com 1 ou 2 nucléolos. As células deciduais, especialmente da região mesometrial, quando coradas pela técnica do PAS, apresentaram amplas regiões PAS positivas (fig. 2) e quando tratadas previamente pela amilase eram predominantemente

PAS negativas (fig. 3). Os depósitos PAS positivos correspondiam as regiões não coradas quando o material era tratado com azul de toluidina ou azur II e fucsina básica.

A maior incidência de vasos sanguíneos foi observada na região mesometrial. A luz uterina era preenchida por sangue materno e, em algumas regiões, havia acúmulo de leucócitos.

As células deciduais encontradas na região antimesometrial e na porção logo abaixo da musculatura, apresentaram um arranjo menos compacto com amplos espaços intercelulares.

A musculatura apresentava-se bem vascularizada, com os núcleos de suas células típicos de musculatura lisa.

Na região mesometrial, próxima do cone ecoplacentário, existia grande quantidade de células em processo de divisão celular (fig. 4).

Epitélio uterino:

Um resquício de epitélio uterino foi observado na região mesometrial. Suas células eram de aspecto prismático, citoplasma basófilo, núcleos de cromatina frouxa e 1 ou 2 nucléolos. Sangue materno extravasado foi visto na luz do útero.

4.1.3) Interação trofoblasto - decídua:

Células trofoblásticas achatadas foram encontradas ao redor do embrião e formaram o trofotoderma. Tais células possuíam inúmeros prolongamentos celulares, os quais permitiam que as células trofoblásticas ligassem-se entre si ou mesmo insinuassem por entre outros tipos celulares como: células sanguíneas, células decíduais ou células endoteliais de vasos sanguíneos. O citoplasma era limitado a uma fina camada ao redor do núcleo. Este último apresentava predomínio de cromatina frouxa, apesar de possuírem grânulos de cromatina densa, além de nucléolos.

No citoplasma das células trofoblásticas observou-se acúmulos de pigmentos amarelos amorfos, muitas vezes associados a vacúolos de maior intensidade cromática, sugerindo ser pigmentos de hemossiderina.

Células trofoblásticas gigantes secundárias estavam concentradas principalmente na região do cone ectoplacentário. Seus núcleos apresentavam predomínio de cromatina frouxa e um grande número de nucléolos corados pelo azul de toluidina (fig. 5). Inúmeras células trofoblásticas gigantes foram evidenciadas com seus prolongamentos celulares se insinuando por entre células decíduais ou mesmo células endoteliais de vasos sanguíneos. O trofoblasto gigante apresentava dimensão celular maior que o trofoblasto achatado, presente nas laterais do embrião.

Ocasionalmente notou-se células gigantes primárias na região anti-mesometrial próximo ao embrião, com seus prolongamentos se insinuando por entre o endotélio de vasos, exercendo intensa atividade invasiva (fig.6).

4.2) 7º dia manhã

4.2.1 - Embrião:

Morfológicamente o embrião caracterizava-se por apresentar uma ampla cavidade pró-amniótica, revestida por ectoderma embrionário e extra-embriônico. O limite de separação entre esses dois tipos de ectoderma não era preciso. A sua diferenciação era feita baseando-se então na sua localização. A porção mais mesometrial em contato com o cone ectoplacentário caracterizava o ectoderma extra-embriônico e a outra porção o ectoderma embrionário (fig. 7).

A visualização do mesoderma tornou-se mais evidente e suas células dispunham-se num arranjo mais irregular e com maior espaço extra-celular entre elas, quando comparadas com os outros tipos celulares.

Tanto a região do cone quanto toda a lateral do embrião apresentava-se banhados por grande quantidade de sangue materno extravasado.

Intensa atividade mitótica foi observada no ectoderma, mesoderma e endoderma.

4.2.2 - Mucosa uterina:

Decídua:

As células decíduais continuavam a apresentar um arranjo epitelióide com poucos espaços intercelulares, com exceção daquelas concentradas próximo da musculatura. A incidência de vacúolos no citoplasma dessas células não corados pela toluidina ou fucsina básica e Azur II foi mais frequente. Pela técnica do PAS foi obtido um resultado PAS positivo nesses vacúolos (fig. 8). Quando tratados previamente com amilase notou-se que nem sempre se observa uma resposta PAS negativa. Um resquício de reação PAS positivo, ainda persistia, apesar de pouca quantidade (fig. 9).

Os vasos sanguíneos foram observados com maior frequência na região mesometrial onde foram encontrados leucócitos próximos a parede destes (fig. 10).

Em toda a extensão do estroma endometrial foram vistas células decíduais com citoplasma celular mais corado pela toluidina ou fucsina básica e Azur II. De maneira geral, apresentavam forma celular mais alongada que as células decíduais convencionais.

Epitélio uterino:

Uma pequena faixa de epitélio uterino foi observada na região mesometrial da cripta uterina. Continuava a haver concentração de sangue extravasado e de leucócitos na área próxima ao epitélio.

4.2.3 - Interação trofoblasto - decídua:

As células trofoblásticas apresentavam núcleo predominantemente eucromático e um grande volume nuclear sugerindo altos índices de poliploidia. Assim como na fase anterior, não foram observadas figuras de mitose nessas células.

Na região do cone ectoplacentário, as células trofoblásticas gradualmente invadiam a região mesometrial na forma de rede trofoblástica. O espaço extra-celular entre estas células encontrava-se preenchido por sangue materno extravasado. No citoplasma, próximo a membrana celular, foram observadas vesículas evidenciadas em imagem negativa (não coradas pela toluidina). Parte dessas vesículas não se coraram pela técnica de PAS, indicando nem sempre tratarem-se de acúmulo de glicogênio. No citoplasma das células trofoblásticas era comum a presença de vacúolos de fagocitose. Associado a presença desses vacúolos foi visto com maior frequência acúmulos de pigmentos amarelos amorfos, sugerindo tratarem-se de pigmentos de hemossiderina.

Foram evidenciadas células trofoblásticas primárias em contato com a parede de vasos sanguíneos, e em muitos casos em contato com a luz destes. Outras células trofoblásticas foram observadas com seus prolongamentos celulares se insinuando com grande intimidade por entre células decíduais (fig. 11).

4.3) 7º dia tarde

4.3.1 - Embrião:

O embrião apresentava três camadas germinativas: o ectoderma (embrionário e extra embrionário) mais internamente, o mesoderma e o endoderma (visceral e parietal) mais externamente. O saco vitelino localizava-se entre o endoderma visceral e parietal e ocupava um espaço bem amplo (fig. 12).

A região de junção entre ectoderma embrionário e extra-embriônico apresentava um progressivo crescimento do mesoderma em direção a cavidade pro-amniótica, em ambas as faces anterior e posterior do embrião. Em consequência disso haverá o encontro do ectoderma das faces opostas.

Nessa fase, na altura da porção final anterior e posterior do ectoderma extra-embriônico, notou-se um processo de cavitação do mesoderma. Este processo marcou o início do exoceloma (fig. 12)

4.3.2 - Mucosa uterina:

Decídua:

O estroma endometrial apresentava-se totalmente decidualizado. As células encontravam-se em um arranjo epitelióide típico. Poucos espaços intercelulares foram observados. Os núcleos eram de cromatina frouxa com 1 ou 2 nucléolos. Em toda a sua extensão foram vistos células deciduais com citoplasma mais corado pela toluidina. Na

região do cone observou-se algumas massas sinciciais de células decíduais. No citoplasma de tais observou-se vacúolos em imagem negativa quando coradas pelo Azul de toluidina ou fucsina básica e Azur II. Seus núcleos eram predominantemente de cromatina frouxa e nucléolos evidentes (fig. 13).

Vacúolos PAS positivos foram observados principalmente na região mesometrial. Estes vacúolos correspondiam aos não corados quando realizada a coloração pelo A. de toluidina ou fucsina básica e Azur II. Quando previamente tratados com amilase salivar, estes vacúolos nem sempre apresentavam-se PAS negativos, persistindo raros acúmulos PAS positivos.

A região mesometrial apresentava-se bem mais irrigada por vasos sanguíneos em comparação com a antimesometrial, onde persistiam leucócitos aderidos a sua parede. O endotélio destes apresentava bem preservado com núcleos e nucléolos evidentes. A região antimesometrial, por sua vez, diminuiu sutilmente de espessura.

Epitélio uterino:

Resquício de epitélio uterino foi observado na região mesometrial da cripta uterina. Tais células apresentavam as mesmas características descritas nas fases anteriores: aspecto prismático, citoplasma acidófilo, núcleos de cromatina frouxa e 1 ou 2 nucléolos.

4.3.3 - Interação trofoblasto-decídua:

Nas regiões equivalentes as laterais embrionárias e antimesometrial foram encontrados um maior número de células trofoblásticas primárias. Flagrantes de projeções trofoblásticas invasivas de tais células puderam ser observadas transpondo os limites do endotélio de vasos sanguíneos (fig. 14).

De modo geral, as células trofoblásticas conviviam intimamente com as células decíduais do estroma, mantendo contato com estas em praticamente toda a sua extensão.

A região do cone caracterizou-se por apresentar duas porções distintas. Uma mais compacta, com menos espaço extra-celular entre suas células e mais próximas do embrião propriamente dito, enquanto que outra mais mesometrial descontínua, com células ligando-se por meio de projeções citoplasmáticas e formando a rede trofoblástica. Entre as malhas desta rede observou-se grande quantidade de células sanguíneas maternas. Já no citoplasma notou-se grande quantidade de vacúolos de maior intensidade cromática, sugerindo vacúolos de fagocitose (fig. 15).

4.4) 7º dia noite

4.4.1 - Embrião:

O embrião encontrava-se banhado por grande quantidade de sangue materno. Três cavidades ocupavam o que correspondia a antiga cavidade pro-amniótica. A mais antimesometrial destas correspondia a cavidade amniótica, revestida por ectoderma embrionário. A mediana correspondia ao exoceloma sendo revestida por mesoderma. Já a situada mais mesometrialmente correspondia a cavidade ectoplacentária, revestida por ectoderma extra-embrionário (fig. 16).

A membrana que separava a cavidade amniótica do exoceloma correspondia ao âmnio e era constituída por duas camadas celulares: ectoderma embrionário e mesoderma. Separando o exoceloma da cavidade ectoplacentária encontrou-se outra membrana conhecida por córion que era constituída de mesoderma e ectoderma extra-embrionário. A cavidade do saco vitelino era delimitada por endoderma visceral e parietal.

Ao nível da cavidade amniótica, iniciando da parte mais externa em direção a parte mais interna do embrião encontrou-se: trofocotoderma, endoderma parietal, saco vitelínico, endoderma visceral, mesoderma e ectoderma embrionário.

4.4.2 - Mucosa uterina

Estroma endometrial:

A região antimesometrial apresentava poucas células em sua espessura e estas foram pouco reativas à reação do PAS. O citoplasma dessas células era mais corado quando comparado com as células da região mesometrial.

A região mesometrial apresentou várias camadas celulares vacuoladas e grande quantidade de vasos sanguíneos. Fato chamativo em relação aos vasos foi a grande quantidade de leucócitos marginais (fig. 17).

Grande parte dos vacúolos celulares vistos na fig. 17 mostrou-se PAS positivo (fig. 18). Quando tratados previamente pela amilase mostraram-se PAS negativo, persistindo no entanto raros acúmulos PAS positivo (fig. 19).

Celulas deciduais com maior intensidade cromática foram observadas por toda a extensão do estroma (fig. 20).

4.4.3 - Interação trofoblasto - decídua:

Nenhuma alteração marcante foi notada nas características morfológicas das células trofoblásticas gigantes. Seus núcleos continuavam sendo predominantemente eucromáticos, poliplóides e circundados apenas por uma fina camada citoplasmática.

Uma evidente diminuição no número celular de trofoblastos gigantes secundários pôde ser notado na região da rede trofoblástica, com correspondente aumento do espaço entre as células gigantes secundárias, em contato com as células deciduais da região mesometrial. Por outro lado, observou-se um relativo aumento da espessura na região correspondente a porção do cone em que as células trofoblásticas encontravam-se arranjadas de forma mais compacta e em contato direto com o embrião (fig. 21).

As células trofoblásticas gigantes primárias foram observadas aprofundando-se no estroma uterino. Notou-se projeções citoplasmáticas insinuando-se por entre as células deciduais e endoteliais. Conseqüentemente devido a esse processo invasivo, persistia o aumento gradativo do espaço ocupado por sangue extravasado ao redor do embrião. Acúmulos de pigmentos amorfos amarelos apareciam no citoplasma de células trofoblásticas.

V - DISCUSSÃO:

Nas fases que sucedem aos fenômenos iniciais da implantação embrionária foram observados padrões de alterações embrionários e deciduais, os quais serão discutidos em tópicos para melhor compreensão.

5.1 - Embrião:

Na madrugada do 7º dia de gestação o embrião de *Calomys* caracterizou-se por apresentar uma dupla camada de folhetos embrionários. A mais interna correspondente ao ectoderma e a outra ao endoderma. Esta relação entre o ectoderma e endoderma encontrada em *Calomys*, assim como em outros roedores, corresponde ao contrário do usualmente observado em outros mamíferos. Isto tem sido chamado como inversão das camadas germinativas (Snell, 1941).

Em *Calomys*, assim como em outros roedores, o saco vitelino, cavidade que envolve o embrião caracterizava-se por ser delimitado pelos folhetos parietal e visceral do endoderma e possuir duas funções basicamente: a de proteção e a de absorção de nutrientes maternos, durante as fases iniciais do desenvolvimento (Rugh, 1967).

Segundo Snell (1941), esta cavidade pode ter derivado da antiga blastocele e por um processo de inversão das camadas germinativas situava-se externamente ao embrião.

Até a tarde do 7º dia de gestação, o embrião de *Calomys* apresentava internamente a cavidade pró-amniótica, por ainda não ter ocorrido a formação da membrana amniótica propriamente dita. Em virtude da expansão desta, o embrião gradualmente ocupava a cavidade do saco vitelino, o qual tornou-se um espaço virtual.

Por volta da manhã do 7º dia, o mesoderma adquiria um aspecto mais característico. Suas células multiplicavam rapidamente e ganhavam caminho por entre o ectoderma e o endoderma. Parte dessas células mesodérmicas estarão posteriormente envolvidas na formação da membrana amniótica e do cório (Snell, 1941).

Na tarde do 7º dia uma cavitação do mesoderma origina o exoceloma. A proliferação dessas células mesodérmicas ocasionou o deslocamento do exoceloma em direção a cavidade pró-amniótica. Resultante dessa proliferação celular, observou-se a união das duas laterais do embrião e a formação de duas outras novas cavidades: a amniótica e a cavidade ectoplacentária. Nesse momento, a antiga cavidade pró-amniótica deu lugar a três novas cavidades: amniótica, exocelomática e ectoplacentária. O aparecimento destas cavidades em *Calomys* são muito semelhante cronologica e morfologicamente ao observado em camundongos (Rugh, 1967).

5.2- Estroma endometrial:

Em muitas espécies de roedores, dentre eles o camundongo, as células decíduais são consideradas como maduras ou completamente desenvolvidas no 6º dia de gestação. Esta transformação envolve uma série de modificações morfológicas ao nível nuclear, citoplasmático e da superfície celular. A maturação das células decíduais ocorre, portanto, em menos de 24 horas após o início da implantação. Este rápido desenvolvimento deve-se provavelmente a necessidade de se estabelecer uma barreira ao redor do embrião que controle a invasibilidade trofoblástica (Abranhansohn, 1983).

Em *Calomys callosus*, apesar da implantação ocorrer no 4º dia, um dia antes que em camundongo (Ferro et al, 1994), a completa maturação das células ocorreu mais tardiamente no 7º dia de gestação.

Um outro aspecto notável da transformação do estroma endometrial foi a presença de células decíduais de dimensões amplas e polinucleadas. Estas células provavelmente

resultem de mitoses sucessivas, sem que contudo ocorrer citocinese celular. A presença dessas células em *Calomys*, assim como em outros roedores, possivelmente esteja relacionada com a função de barreira à invasão trofoblástica (Abrahamsohn, 1983).

A região mediana do estroma localizada entre a porção mesometrial e antimesometrial, apresentou-se rica em depósitos de glicogênio especialmente na região mesometrial. A presença de glicogênio nessa área foi demonstrada histoquimicamente usando o periodic acid-Schiff (PAS). No entanto, esta técnica não é específica somente para a identificação de glicogênio, como também responsável pela marcação de glicoproteínas. Com o tratamento prévio do material com amilase salivar notou-se que persistia ainda alguma reação PAS positiva. Com isto mostrou-se que nestas áreas havia grande quantidade de glicogênio e algum outro material PAS positivo, provavelmente glicoproteínas.

Estes resultados são coincidentes com os encontrados por Abrahamsohn (1993) usando microscopia eletrônica.

Segundo Parkening et al (1974), o glicogênio é degradado e posteriormente transportado por um elaborado sistema labiríntico de vasos sanguíneos para as áreas adjacentes ao embrião. O seu acúmulo estaria relacionado com a função de nutrir o embrião, ao ponto de que o seu desaparecimento ocasionaria a morte deste.

A assimilação e utilização do glicogênio é possível graças à ação da progesterona. Se um útero for incapaz de manter quantidades suficientes de progesterona na circulação, este será incapaz de manter um processo de acúmulo de glicogênio (Parkening et al, 1974).

Esporadicamente foram encontrada células decíduais com padrão morfológico alterado, lembrando células em processo de degeneração. Dentre essas alterações, a

mais marcante foi o aumento da intensidade cromática nuclear e citoplasmática. Durante o período estudado, não ficou claro se isto caracterizava um processo de involução decidual, como o observado em estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário em ratos ou camundongos (Ferro, 1991). O processo de involução ocorre na mesma direção em que se processou a sua formação, do centro para o miométrio. Acredita-se que esta involução se faz devido a um tipo de programação de morte celular conhecida como degeneração autofágica. De certa maneira, este fato facilitaria o processo de invasão trofoblástica do estroma endometrial e sua conseqüente chegada ao vasos sanguíneos da região mesometrial (Abrahamsohn, 1993).

Em *Calomys*, assim como em rato (Abrahamsohn et al, 1993), a região mesometrial uterina apresentou-se extremamente vascularizada. Esta característica está relacionada com a formação da placenta nessa região nos estágios mais avançados do desenvolvimento. Em conseqüência, essa área requer um grande acúmulo de nutrientes (Welsh et al, 1987), justificando assim o acúmulo de glicogêneo nesta região.

5.3- INTERAÇÃO TROFOBLASTO - DECÍDUA:

Durante o 7º dia de gestação, em *Calomys callosus*, uma fina camada de células trofoblásticas primárias dispunham-se ao redor do embrião, entre o endoderma parietal e a decídua. Outra porção trofoblástica foi também observada na região mesometrial do

embrião correspondendo ao cone ectoplacentário, onde ocorreu a formação da rede trofoblástica.

As células trofoblásticas gigantes de ratos e camundongos são pouco agressivas e não estabelecem uma intensa atividade invasiva da decídua (Abrahamsohn et al, 1993). Já em *Calomys*, as células trofoblásticas eram muito agressivas e adquiriam uma intensa atividade invasiva entre células decíduais e vasos sanguíneos resultando em grande acúmulo de sangue materno que passava a banhar o embrião.

Em ratos e camundongos (Welsh et alii, 1987; Bevilacqua et alii, 1989) o trofoblasto invade e fagocita as células decíduais em processo de degeneração. Já em *Calomys*, o trofoblasto não assume uma atividade fagocítica preferencial no processo de invasão, o provável é que o trofoblasto abre caminho por entre as células decíduais íntegras, podendo ocasionalmente fagocitá-las (Ferro et al, 1994).

Em ratos e camundongos, as células trofoblásticas caminham em direção aos vasos do estroma, à medida em que fagocita as células decidualizadas. Com o progresso da invasão, o trofoblasto rompe as junções entre as células endoteliais e passa a ocupar a posição de células endoteliais (Welsh et al, 1987). Por outro lado, alguns estudos demonstravam que células decíduais penetram na lâmina basal do endotélio (O'Shea et alii, 1983; Welsh, 1985; Parr et alii, 1986), onde células decíduais estabelecem contato com as células endoteliais dos vasos. É provável então, que as células trofoblásticas acabem por ocupar o espaço dessas células decíduais ao chegar aos vasos materno (Welsh et al, 1987). O trofoblasto parece poder formar junções com as células endoteliais adjacentes; não há evidência de apoptose das células endoteliais, embora algumas vezes parece haver necrose ou mesmo alterações osmóticas que levam ao rompimento das células (Welsh et al, 1987). Segundo Welsh et al (1987) a câmara

(cavidade) de implantação sofre um rápido aumento em suas dimensões e as mitoses das células endoteliais dos vasos sanguíneos não acompanham o ritmo das alterações ocorridas na decidua, assim o endotélio torna-se descontínuo, propiciando a localização do trofoblasto por entre células decíduais.

Intensa fagocitose de elementos sanguíneos foi evidenciada a partir do momento em que ocorre ruptura dos vasos, onde observa-se grandes acúmulos de pigmentos amarelos, sugerindo ser hemossiderina, no citoplasma de células trofoblásticas. A hemossiderina é resultante do processo de digestão de hemáceas (Ross,1993). A presença deste pigmento no citoplasma das células trofoblásticas indica estar havendo digestão de hemáceas por parte do trofoblasto.

A fagocitose de elementos sanguíneos maternos (nutrição hemotrófica) e do transporte de metabólicos do sangue materno para o organismo embrionário é um papel desempenhado pelas células trofoblásticas, tornando-se assim responsáveis pela nutrição do embrião antes do estabelecimento da placenta (Welsh et alii, 1987).

Em *Calomys* e outros roedores (Enders et al, 1993) nos momentos que precedem a formação da placenta, observou-se uma intensa invasão da região mesometrial pela rede trofoblástica. A decidua dessa área caracterizou-se por ser extremamente rica em acúmulos de glicogênio e possuir uma grande concentração de vasos sanguíneos.

No processo de invasão, as células trofoblásticas secundárias da rede na região mesometrial, ocupavam o espaço das células decíduais ricas em glicogênio e passavam a ser banhadas por grande quantidade de sangue materno.

Durante a implantação e os eventos que precedem a formação da placenta, inúmeros fenômenos fisiológicos imuno-protetores ocorrem no sentido de não haver rejeição do tecido embrionário. Não se sabe exatamente quais os mecanismos realmente

envolvidos nesse processo. No entanto, a tolerância ou redução nos efeitos da resposta imunológica materno-embrião é vital para o sucesso do desenvolvimento embrionário (Enders et al, 1993).

VI - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho, nos permitiram tirar as seguintes conclusões:

1) No decorrer do 7º dia de gestação ocorre a formação do exoceloma e a conseqüente delimitação de três cavidades embrionárias: a ectoplacentária, a exocelomática e a amniótica.

2) Com a expansão e crescimento do embrião, este acaba gradualmente ocupando o espaço do saco vitelino, o qual torna-se um espaço virtual.

3) A completa maturação das células decíduais em *Calomys callosus* ocorre no 7º dia de gestação, mais tardiamente do observado em camundongos.

4) Durante o processo de invasão da decídua pelas células trofoblásticas, encontraram-se esporadicamente células deciduais com padrão morfológico alterado, lembrando células em processo de degeneração. Contudo não se observou um processo de involução decidual característico.

5) No estroma endometrial, próximo ao cone ectoplacentário, encontraram-se células deciduais com dimensões maiores e plurinucleadas, lembrando em muito um sincício. Possivelmente este fato constitui um artifício utilizado pela decídua na tentativa de estabelecer uma barreira à atividade invasiva das células trofoblásticas.

6) A região mediana do estroma apresenta-se rica em depósitos de glicogênio e outro material PAS positivo. O glicogênio presente nessa região está envolvido com a função de nutrição do embrião.

7) A ocorrência de vasos sanguíneos na região mesometrial aumenta gradativamente com o decorrer do desenvolvimento. Esta região está relacionada com a formação da placenta, e em virtude disto, requer um grande acúmulo de nutrientes.

8) As células trofoblásticas de *Calomys* assumem uma intensa atividade invasiva quando comparada a outros roedores. Em contrapartida estas mesmas não adquirem uma atividade fagocitária preferencial durante a invasão do estroma endometrial, como o observado em camundongos e ratos.

9) A intensa fagocitose de hemáceas do sangue materno extravasado pelas células trofoblásticas é demonstrada pela evidenciação de acúmulos de pigmentos de hemossiderina em seus citoplasmas.

10) As células trofoblásticas exercem uma intensa invasão de vasos sanguíneos mesometriais sendo, portanto, responsáveis pela nutrição do embrião nas fases do desenvolvimento que precedem o estabelecimento da placenta.

VII- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

PRANCHA 1 - Madrugada do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 1 - Visão panorâmica do embrião. Notar o embrião (E) no centro da figura. Na sua porção mais mesometrial do embrião observar o cone ectoplacentário (CE). No interior do embrião encontra-se a cavidade pró-amniótica (cpa). O estroma endometrial apresenta-se totalmente decidualizado (D). No canto superior esquerdo detalhe da lateral do embrião mostrando os dois folhetos embrionários: ectoderma (Ec) e endoderma (Ed). Notar também células trofoblásticas gigantes primárias (➡). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 84 x, detalhe - 365x.



PRANCHA 2 - Madrugada do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 2 - Visão parcial da região mesometrial mostrando acúmulos PAS positivos (→) na decídua. Fotomicrografia, Histoiresina, PAS, hematoxilina, 185x.

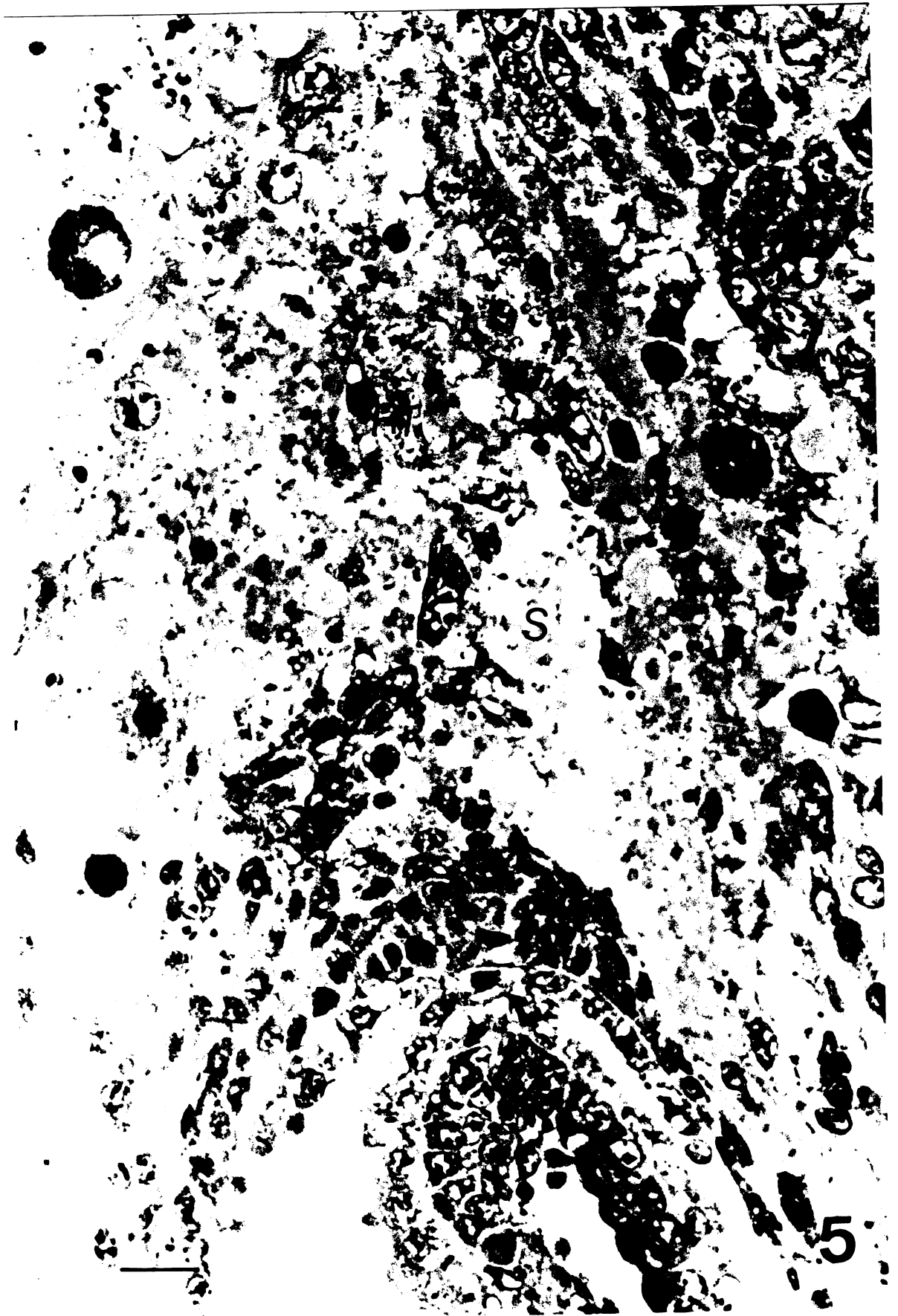
Figura 3 - Visão parcial da região mesometrial mostrando um predomínio de acúmulos PAS negativo (*) na decídua. Um resquício de reação PAS positivo ainda pode ser observado (→). Fotomicrografia, Histoiresina, reação com amilase salivar, 119x.

Figura 4 - Região mesometrial mostrando células decíduais em divisão mitótica (➡). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 285x.



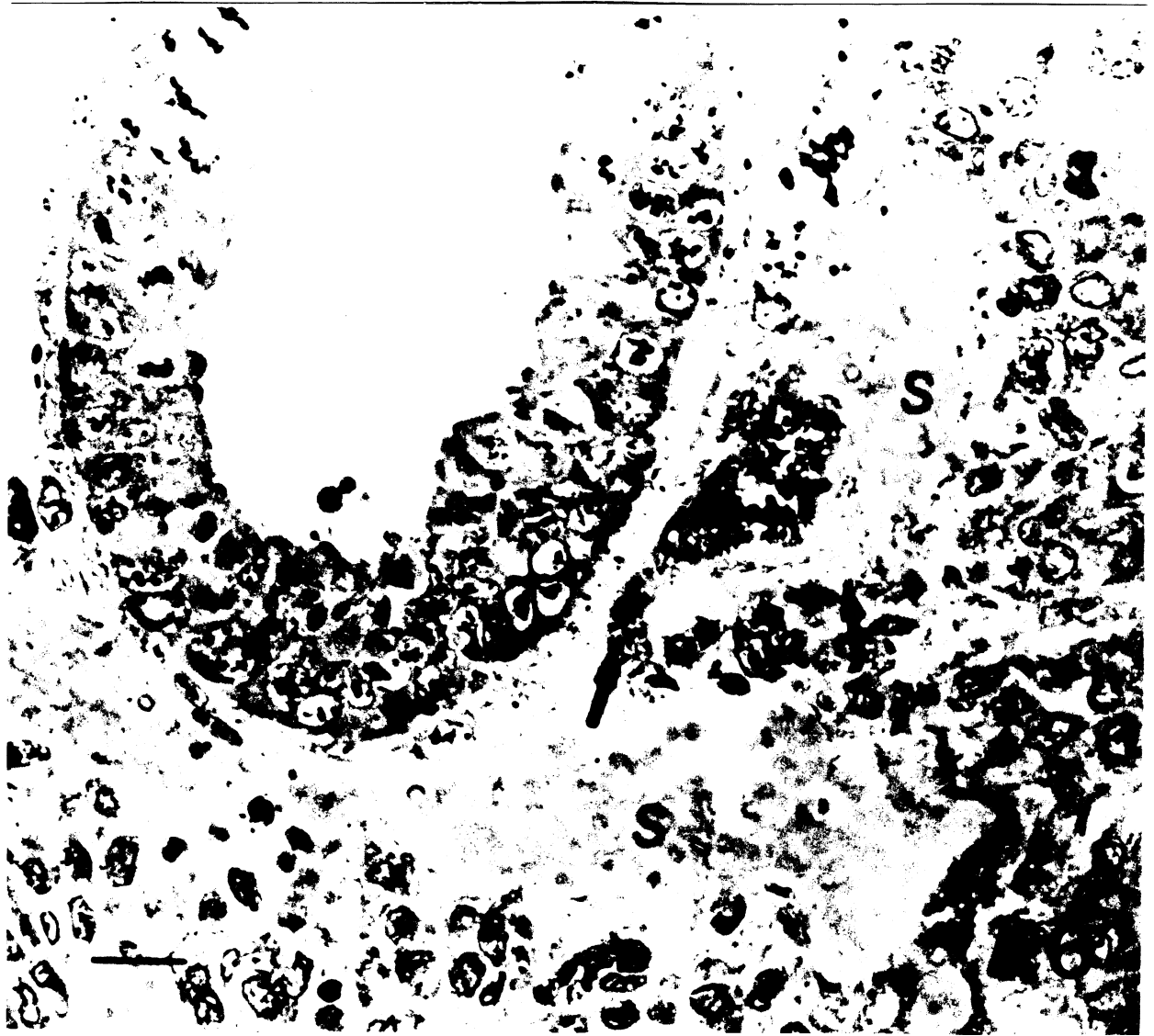
PRANCHA 3 - Madrugada do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 5 - Visão parcial do cone ectoplacentário mostrando as células trofoblásticas gigantes secundárias da rede trofoblástica (RT), onde observam-se núcleos amplos e nucléolos evidentes, banhando tal rede nota-se sangue materno extravasado (S). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 320x.



PRANCHA 4 - Madrugada do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 6 - Porção antimesometrial do embrião mostrando na sua lateral a presença de uma célula trofoblástica gigante primária (T) com prolongamento se insinuando por entre as células deciduais (→) e banhado por sangue materno (S). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 280x.



PRANCHA 5 - Manhã do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 7 - Visão panorâmica do embrião. Observe-se o embrião constituído internamente pela cavidade pró-amniótica (cpa), ectoderma embrionário (➡), ectoderma extra-embrionário (→), endoderma (★), células trofoblásticas (*) e banhado por grande quantidade de sangue materno extravasado (✱). Apresenta ainda rodeado pelo estroma endometrial decidualizado (D). A região da rede trofoblástica (RT) avança em direção a porção mesometrial. Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 75x.



PRANCHA 6 - Manhã do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 8 - Região mesometrial do estroma endometrial. Observa-se as áreas de acúmulo PAS positivo (→) na decídua. Fotomicrografia, Histoiresina, PAS, hematoxilina, 46 x.

Figura 9 - Mesma área da figura anterior tratada com amilase salivar. Observa-se grandes áreas PAS negativa, juntamente com alguns pontos PAS positivos (→). Fotomicrografia, Histoiresina, reação pela amilase salivar, PAS - hematoxilina, 46x.

Figura 10 - Estroma endometrial localizado na região mesometrial. Observa-se nessa área a maior concentração de vasos sanguíneos (V). Nessa fotomicrografia pode se observar uma pequena faixa da musculatura uterina (M). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 60x.



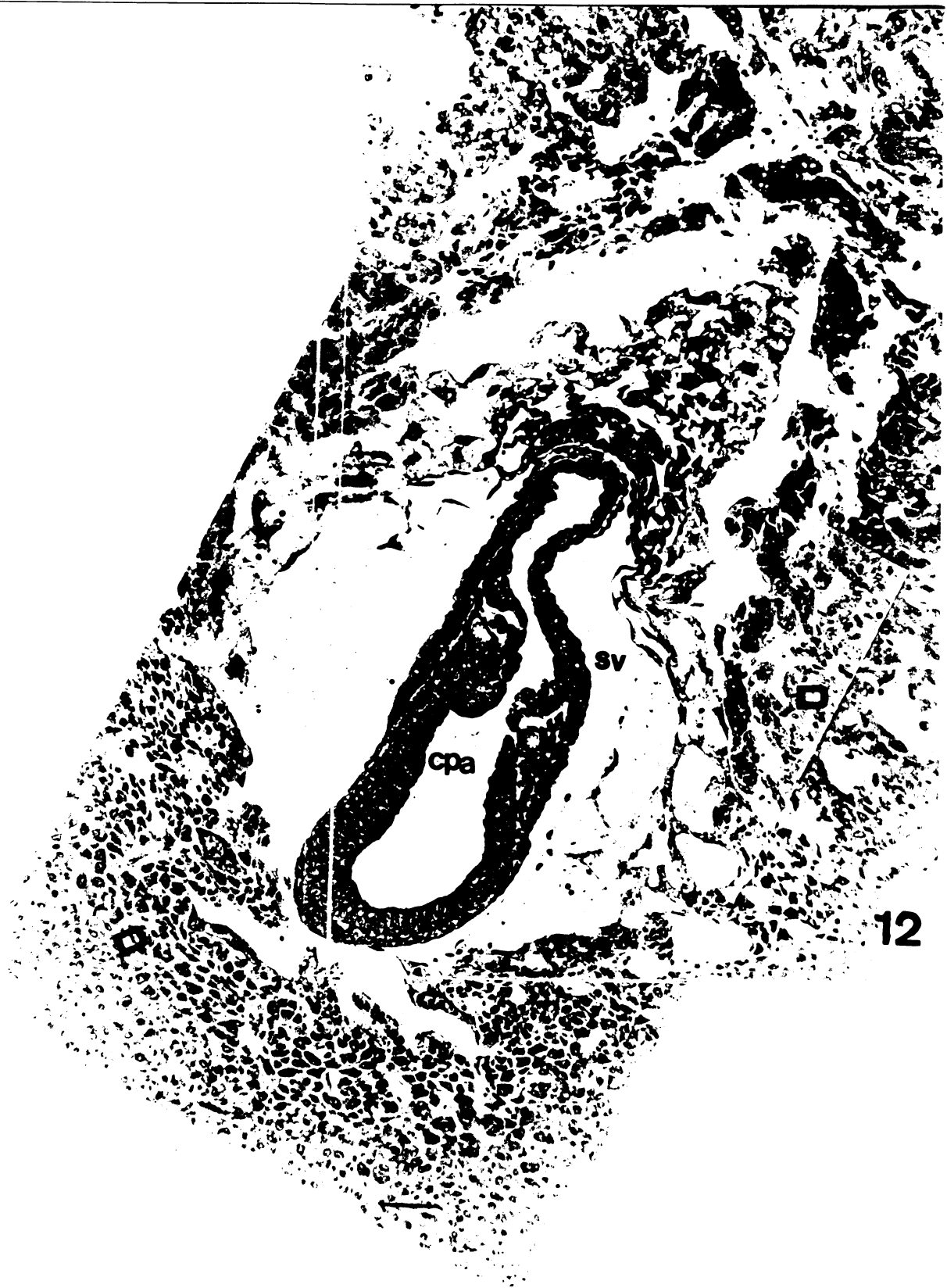
PRANCHA 7 - Manhã do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 11 - Observar uma célula trofoblástica gigante(T) com seus prolongamentos citoplasmáticos (→) se interpondo por entre células deciduais (D) e próximos a vasos sanguíneos (V). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 280x.



PRANCHA 8 - Tarde do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 12 - Visão panorâmica do embrião circundado pela decídua (D). Observar um início de cavitação do mesoderma, originando a cavidade exocelomática (*). Externamente ao embrião uma extensa cavidade do saco vitelino (sv) e internamente ao embrião a cavidade pró-amniótica (cpa). O conectoplacentário dividido em duas porções, uma mais compacta (★) e outra menos correspondendo a rede trofoblástica (RT). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 60x.



12

PRANCHA 9 - Tarde do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

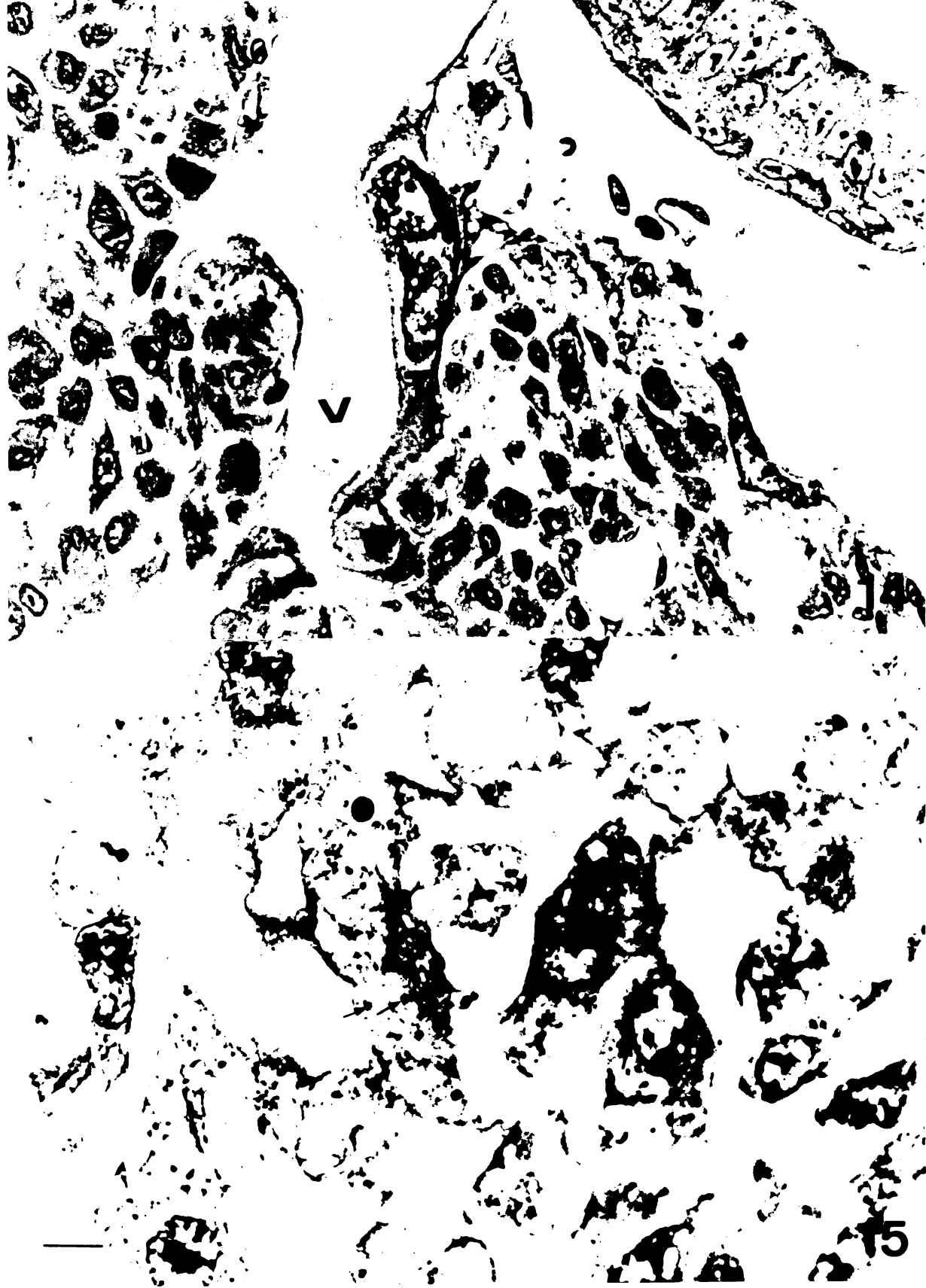
Figura 13 - Observar uma massa sincicial de células decíduais (S) próxima a região da rede trofoblástica (RT). No seu citoplasma notam-se vacúolos em imagem negativa (→). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 980x.



PRANCHA 10 - Tarde do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

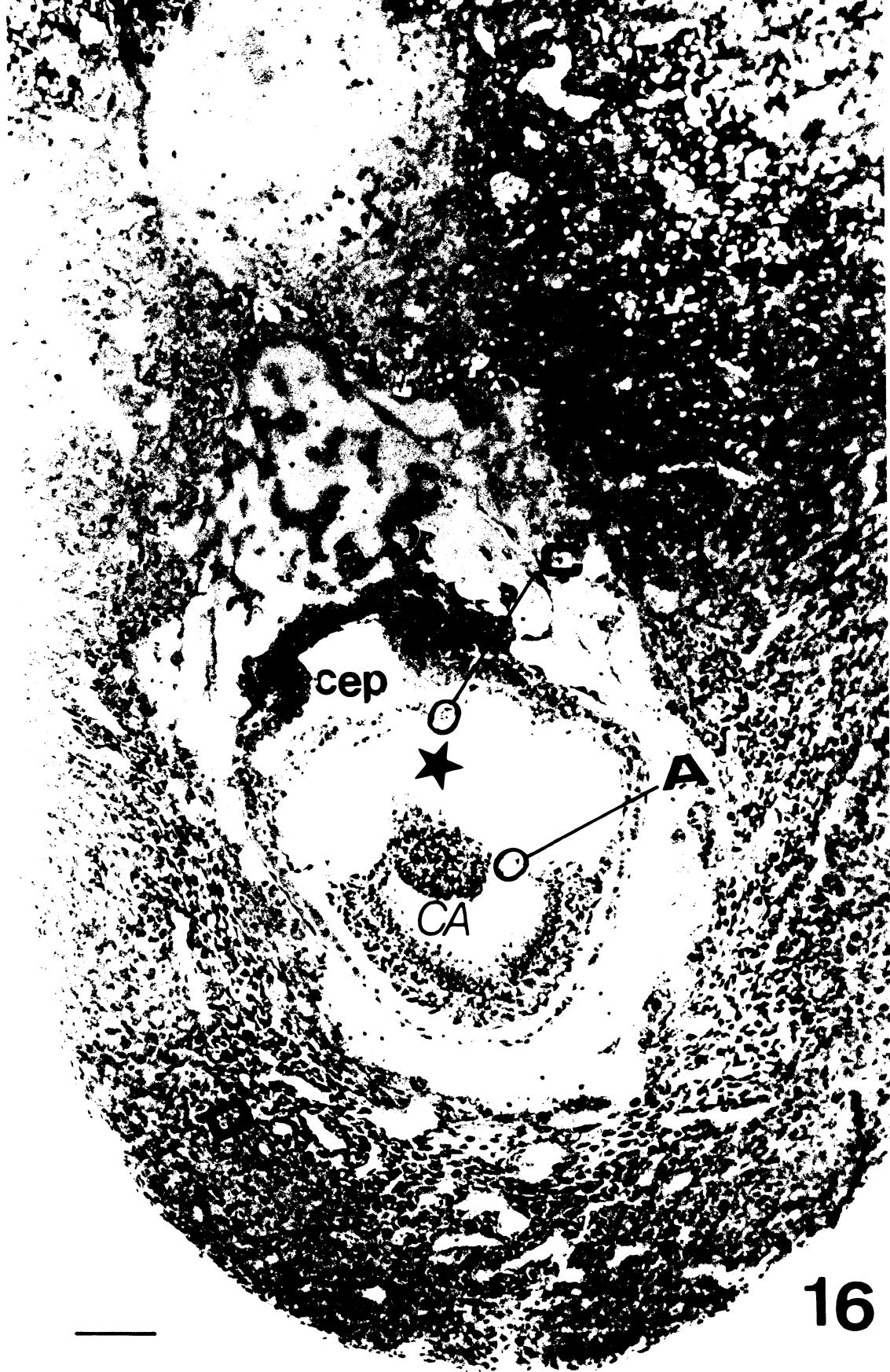
Figura 14 - Observar uma célula trofoblástica (T) com seus prolongamentos citoplasmáticos (→) se insinuando por entre o endotélio de um vaso sanguíneo (V) e células deciduais (D). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 315x.

Figura 15 - Visão parcial da rede trofoblástica mostrando no citoplasma das células trofoblásticas (T) grande quantidade de vacúolos de maior intensidade cromática (→). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 440x.



PRANCHA 11 - Noite do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 16 - Visão panorâmica do embrião mostrando três cavidades internas: a cavidade amniótica (CA), a cavidade exocelomática (★) e a cavidade ectoplacentária (cep). A membrana que separa a cavidade amniótica da cavidade exocelomática é conhecida como âmnion (A) e a membrana que separa a cavidade exocelomática da cavidade ectoplacentária é chamada de córion (C). Ao redor do embrião observa-se a decídua (D). Fotomicrografia, Histo-resina, azul de toluidina, 54x.



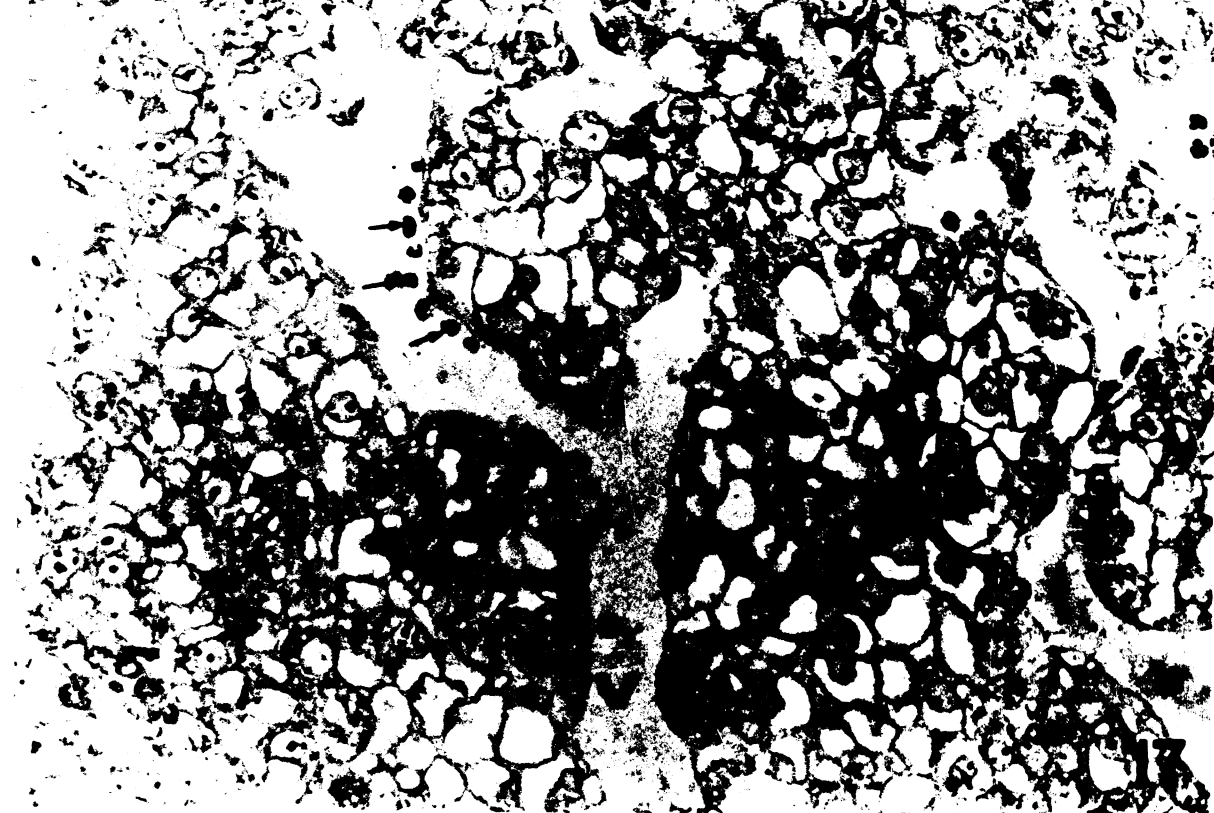
16

PRANCHA 12 - Noite do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

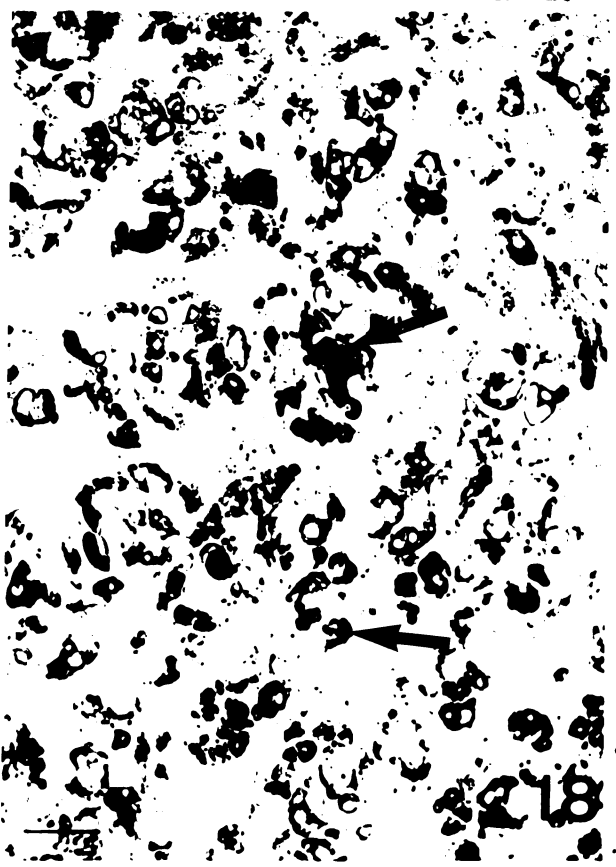
Figura 17 - Vaso sanguíneo (V) da região mesometrial mostrando leucócitos próximos a sua parede (→). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 200x.

Figura 18 - Região mesometrial do estroma endometrial. Observar as áreas de acúmulo PAS positivos (→) na decídua. Fotomicrografia, Histoiresina, reação pelo PAS, 148x.

Figura 19 - Mesma área da figura anterior com tratamento prévio com amilase salivar seguido de PAS. Observar grandes áreas PAS negativa apesar de ainda persistir um resquício de reação PAS positiva (→). Fotomicrografia, Histoiresina, reação pela amilase salivar, PAS-Hematoxilina, 150x.



17



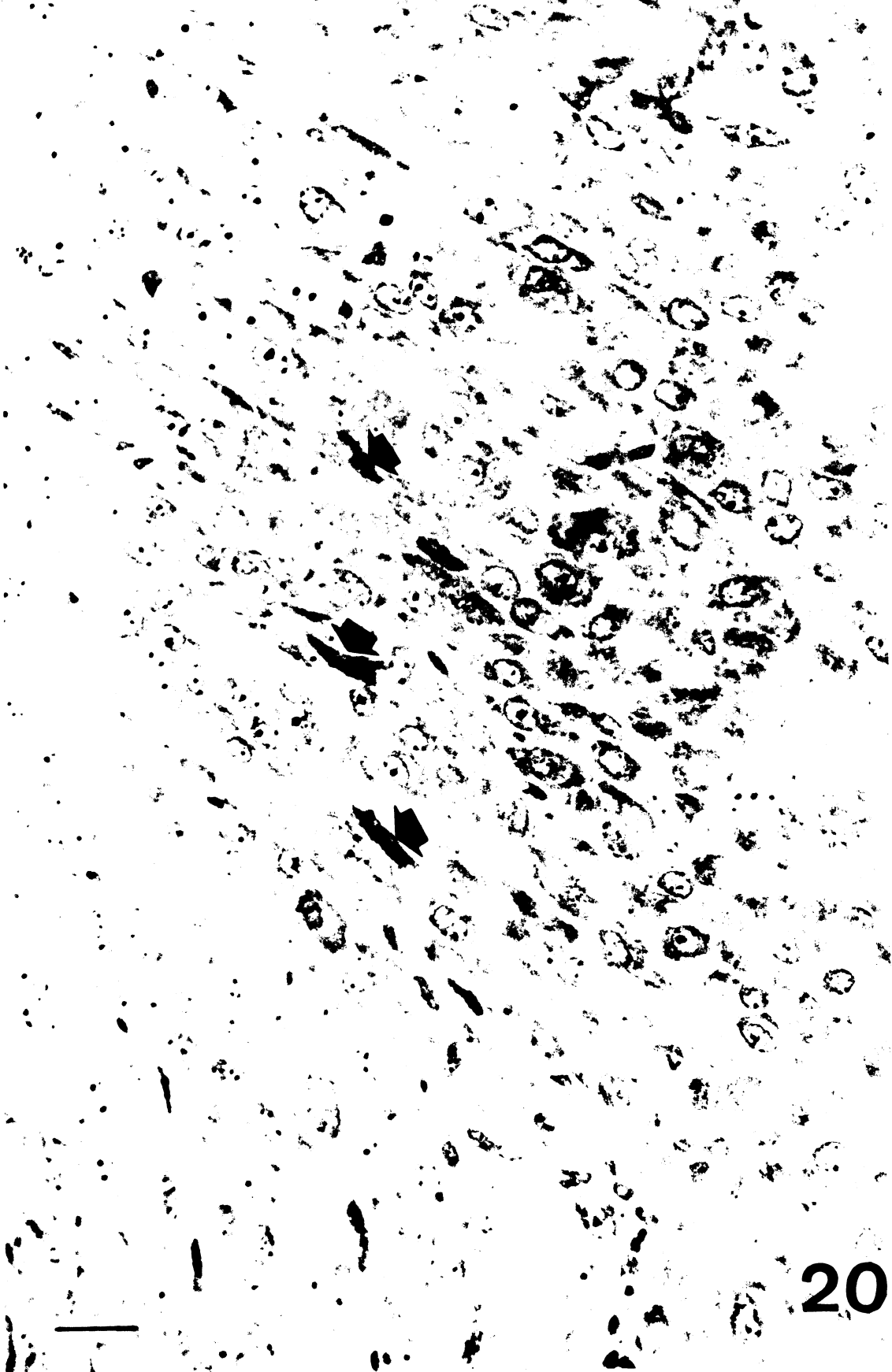
18



19

PRANCHA 13 - Noite do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 20 - Células decíduais com maior intensidade cromática (➡) são observadas por toda a extensão de estroma. Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 250x.



20

PRANHCA 14 - Noite do 7º dia de gestação de *Calomys callosus*

Figura 21 - Porção compacta do cone ectoplacentário (CE) em contato direto com a cavidade ectoplacentária (cep). Fotomicrografia, Histoiresina, azul de toluidina, 250x.



21

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹ :

- ABRAHAMSOHN, P. A. (1983). Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol. (Berl.)*, **166**: 263-273.
- ABRAHAMSOHN, P. A., ZORN, T. M. T. (1993). Implantation and decidualization in Rodents. *The journal of experimental zoology*, **266**: 603 - 628.
- ALBERT-RINCON, M. C., ZORN, T. M. T. and ABRAHAMSOHN, P. A. (1989). Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Amer. J. Anat.*, **186**: 417-429
- ALMEIDA, C. R. (1973). **Relatório das Pesquisas do Plano Piloto de peste em Exu.** Centro de Pesq. Ag. Magalhães - Ministério da Saúde.
- BEVILACQUA, E. M. A. F., KATZ, S. and ABRAHAMSOHN, P. A. (1985). Contact between trofoblast and antimesometrial decidual cells in the mouse. *Microscopia Electronica y Biologia celula*, pp. 45-49.

¹ Referências feitas seguindo sugestão apresentada pela Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

- BEVILACQUA, E. M. A. F. and ABRAHAMSOHN, P. A. (1988). Ultrastructure of Trofoblast giant cell transformation during the Invasive stage of implantation of the mouse stage. *J. of Morph.*, **198**: 341-351.
- BEVILACQUA, E. M. A. F. and ABRAHAMSOHN, P. A. (1989). Trofoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch. Biol. Med. Exp.*, **22**: 107-11.
- BLANKENSHIP, T. N., GIVEN, R. L. and PARKENING, T. A. (1990). Blastocyst implantation in the chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *Amer. J. Anat.*, **187**: 137-157.
- CHAVEZ, D. J. and ANDERSON, T. L. (1985). The glycocalix uterine luminal epithelium estrus, arly pregnancy, the peri-implantation period and delayed implantation. Acquisition of Ricines Communis I binding sites during pregnancy. *Biol. Reprod.*, **32**: 1135-1142.
- 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. (1972). Implantation in the ferret: epithelial penetration. *Amer. J. Anat.*, **133**: 291-316.
- ENDERS, A. C. (1972). Mechanisms of Implantion of the blastocyst. *Biol. Reprod.*, **32**: 313-333.
- ENDERS, A. C., WELSH, A. O. (1993). Structural interations of trofoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *The journal of experimental zoology*, **266**: 578 - 587.
- FARACH, M. C., TANG, J. P., DENKER, G.L. and CARSON, D.D. (1987). Heparin/heparan sulfates are involved in attachment and spreading of mouse embryos in vitro. *Dev. Biol.*, **123**: 401-410.
- FERRO, E. A. V. (1991). Estudo da interface materno embrionária em etapas iniciais da implantação embrionária em *Calomys callosus*. São Paulo [Tese de mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

- FERRO, E. A. V. and BEVILACQUA, E. (1994). Trophoblast invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (rodentia, Cricetidae). *J. Morph.*, **221**: 139-152.
- FINN, C. A. and MCLAREN, A. (1967). Study of the early stage of implantation in mice. *J. Reprod. Fert.*, **13**: 259-267.
- HAKANSSON, S. and SUNDKVIST, K. G. (1975). Decreased antigenicity of mouse blastocysts after activation for implantation delay. *Transformation*, **19**: 479-484.
- HEDLUND, K. and NILSSON, O. (1971). Hormonal requirements for the uterine attachment reaction and blastocyst implantation in the mouse, hamster and guinea-pig. *J. Reprod. Fert.*, **26**: 267-269.
- HEDLUND, K., NILSSON, O., REINIUS, S. and ÅMAN, G. (1972). Attachment reaction of the uterine luminal epithelium at implantation: light and electron microscopy of the hamster, guinea-pig, rabbit and mink. *J. Reprod. Fert.*, **29**: 131-132.
- HERTZ, Z., KHAN, I., JAYATILAK, P. G. and GIBORI, G. (1985). Evidence for the synthesis and secretion of decidual luteotropin: a prolactin like hormone produced by rat decidual cells. *Endocrinology*, **118**: 2203-2209.
- ILGREN, E. B. (1983). Review article: Control of trophoblast growth. *Placenta*, **4**: 307-328.
- JUSTINES, G. and JOHNSON, K. M. (1969). Immunetolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. *Nature*, **22**: 1090 - 1091.
- McMANUS, J. F. (1948). A. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Thchnology*, **23** (3): 99 - 100.
- MELLO, D. A. 1978. Biology of *Calomys callosus* (Renger, 1830) under laboratory condicions (rodenta, Cricetinae). *Rev. Bras. Biol.*, **38**(4): 807-811.
- NILSSON, B. O. (1966). Structural differentiation of luminal membrane in rat uterus during normal and implantation. *Ztschr. Anat.*, **125**: 152-159.

- NILSSON, B. O. (1967). Attachment of rat and mouse blastocyst onto uterine epithelium. *Int. J. Fert.*, **12**: 5-13.
- O'SHEA, J. D., KLEINFELD, R. G. and MORROW, H. A. (1983). Ultrastructure of decidualization in the pseudopregnant rat. *Am. J. Anat.*, **166**: 271-298.
- PARKENING, T. A., SORDEWALL, A. L. (1974). Histochemical localization of glycogen in preimplantation and implantation stages of young and senescent golden hamster. *J. Reprod. Fert.*, **41**: 285 - 295.
- PARR, M. B., TUNG, H. N. and PARR, E. L. (1986). The ultrastructure of the rat primary decidual zone. *Am. J. Anat.*, **176**: 423-43
- REINIUS, S. (1967). Ultrastructure of blastocyst attachment in mouse. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **77**: 257.
- RIBEIRO, R. D. (1973). Novos reservatórios do *Trypanossoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.*, **33(3)**: 429-437.
- ROSS, M. H. and ROWELL, L. J. (1993). Sistema Respiratório In: *Histologia - texto e atlas*. 2ª ed. São Paulo: Panamericana, p. 511-3.
- ROUGH, R. (1967). Normal development of the mouse. In: *The mouse, its reproduction and development*. 1ª ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 44-101.
- SCHCLAFKE, S. and ENDERS, A. C. (1975). Cellular basis of interation between trofoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.*, **12**: 41-65.
- 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**: 24-56.
- SNELL, G. D. (1941). *Biology of the laboratory mouse* in *The early embryology of the mouse*. Blankiston, Phladelphis. 497 pp.
- WELSH, A. O. (1985). Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emplasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Amer. J. Anat.*, **172**: 1-29.

WELSH, A. O. and ENDERS, A. C. (1987). Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.*, 217: 203-219.