

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão de glicoproteínas na interface materno-embrionária em etapas precoces da
gestação em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

Loyane Bertagnolli Coutinho

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 - MG

Julho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão de glicoproteínas na interface materno-embriônica em etapas precoces da
gestação em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

Loyane Bertagnolli Coutinho

Prof^ª. Dr^ª. Eloísa Amália Vieira Ferro

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 – MG

Julho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão de glicoproteínas na interface materno-embriônica em etapas precoces da
gestação em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

Loyane Bertagnolli Coutinho

Prof^ª. Dr^ª. Eloísa Amália Vieira Ferro
Citologia/Histologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Vera Lúcia de Campos Brittes

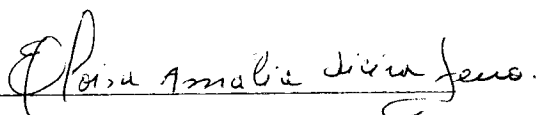
Uberlândia – MG
Julho - 2007

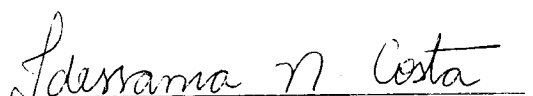
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão de glicoproteínas na interface materno-embriônica em etapas precoces da
gestação em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

Loyane Bertagnolli Coutinho

Aprovado pela Banca Examinadora em: 20/07/07 Nota: 100,0


Profª. Dr. Eloísa Amália Vieira Ferro
(Orientadora)


Profª. Msª. Idessania Nazareth da Costa
(Co-orientadora)


Profª. Msª. Bellisa de Freitas Barbosa
(3º membro da banca examinadora)

Uberlândia, 20 de julho de 2007

A meus pais, Amaury e Regina, pelo amor e exemplo de perseverança.

Á Prof^a. Dr^a. Eloísa Amália Vieira Ferro, pela orientação, dedicação e empenho para a realização deste trabalho.

Á Prof^a. Ms^a. Idessania Nazareth da Costa, agradeço especialmente pelo convívio, apoio, colaboração e incentivo.

Resumo

A receptividade endometrial é definida como a capacidade da mucosa uterina em permitir o sucesso da implantação embrionária. O período de máxima receptividade, que culmina na adesão e invasão do blastocisto no endométrio, é chamado janela de implantação. Glicoproteínas são potenciais marcadores biológicos da receptividade endometrial e desempenham algumas funções essenciais ao longo da implantação embrionária. A invasão do estroma uterino é particularmente acentuada em *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). Este trabalho objetivou analisar as alterações morfológicas no epitélio uterino de *C. callosus* durante a janela de implantação devido ao fato de que este modelo experimental mantém semelhança, em termos gestacionais, com o que ocorre nos humanos. Para tanto, foram utilizadas seis fêmeas destes animais, as quais foram sacrificadas nos 3º, 4º e 5º dias gestacionais, laparatomizadas e o útero foi removido para inclusão em glicolmetacrilato e parafina. Posteriormente foram realizados testes histoquímicos (PAS e marcações específicas com lectinas) e observou-se a presença de glicoproteínas no epitélio uterino durante a janela de implantação, sugerindo que estes componentes podem desempenhar importantes funções nesta fase, bem como para o sucesso da implantação embrionária.

Palavras-chaves: Glicoproteínas, *Calomys callosus*, Janela de implantação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Implantação embrionária.....	1
1.2. Modelo experimental <i>Calomys callosus</i>	11
1.3. Útero de <i>Calomys callosus</i>	12
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Animais de experimentação.....	16
3.2. Acasalamento e detecção de prenhez.....	16
3.3. Coleta do material.....	16
3.4. Processamento do material para análise morfológica.....	17
3.5. Processamento do material para estudo histoquímico.....	17
3.5.1. PAS (ácido periódico de Schiff).....	17
3.5.2. Conjugação das lectinas com a biotina.....	18
3.6. Normas de biossegurança.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Legendas e documentação fotográfica.....	21
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Implantação embrionária

A implantação embrionária representa o mais crítico passo do processo reprodutivo em várias espécies. Ela consiste em um fenômeno biológico único pelo qual o blastocisto torna-se intimamente conectado à superfície endometrial materna para formar a placenta, que irá prover a relação entre o organismo fetal e materno (DENKER, 1993; APLIN, 2000). O sucesso da implantação requer o endométrio receptivo, embrião normal e funcional no estágio de desenvolvimento do blastocisto e uma relação sincronizada entre os tecidos materno e embrionário (SIMON et al., 2000).

A implantação embrionária apresenta três fases: aposição, adesão e invasão. Estas fases são distintas, porém, consecutivas, sendo que a aposição e a adesão ocorrem em todas as espécies, enquanto que a invasão ocorre somente nos mamíferos, excetuando as espécies que possuem placentação do tipo epiteliocorial. A fase de aposição caracteriza-se por uma aproximação gradativa dos organismos materno e embrionário, de modo que o contato entre trofoblasto e epitélio uterino torna-se progressivamente mais complexo. Nesta fase ainda não existem conexões estruturais firmes entre o trofoblasto e o epitélio uterino (FERRO, 1991).

A fase de adesão caracteriza-se pela obliteração do lúmen uterino com associação cada vez mais íntima do epitélio com o trofoblasto. Nesta fase, extensas áreas de membranas das células trofoblásticas mantêm estreita proximidade com as membranas apicais das células epiteliais. Já a invasão, é uma fase na qual os embriões ganham acesso ao estroma endometrial, ultrapassando a barreira epitelial uterina, ou seja, é um processo de invasão através do epitélio uterino cujo grau de invasão varia de espécie para espécie (FERRO, 1991).

O processo de implantação requer uma interação harmônica entre o endométrio receptivo e o blastocisto funcional, ou seja, o embrião deve alcançar o desenvolvimento adequado e estar apto para desempenhar seu papel no processo de implantação, ao mesmo tempo em que o endométrio já deve ter sofrido uma série de alterações hormônio-dependentes para que se torne receptivo ao embrião (FERRO, 1991). Este fenômeno

hormônio-dependente só ocorre durante a janela de implantação, um período próprio limitado da receptividade endometrial de curta duração entre os 20 e 24 dias do ciclo menstrual (ACHACHE; REVEL, 2006).

Sendo assim, os hormônios sexuais são essenciais para a proliferação e decidualização do endométrio. Após a ovulação, a progesterona transforma o endométrio em uma estrutura essencialmente secretora, sendo que essas secreções são de suma importância para o processo de implantação e/ou desenvolvimento do blastocisto, resultado de um perfeito equilíbrio hormonal estrógeno-progesterona durante o ciclo menstrual (D' HAUTERIVE et al., 2002).

Independentemente da espécie estudada, o processo de implantação em todos os mamíferos eutéricos compreende as fases de aposição e adesão do embrião ao epitélio uterino, enquanto que a fase de penetração do epitélio, invasão do estroma endometrial e a formação do tecido decidual pelo útero, são peculiaridades de algumas espécies (FERRO, 1991). Assim, a implantação não envolve os mesmos mecanismos, nem é um evento que se estabeleça no mesmo momento entre as diferentes espécies de mamíferos, tornando difícil compreendê-la em sua totalidade (FERRO, 1991), além disso, os estudos envolvendo tal assunto são dificultados, principalmente *in vivo*, devido às questões éticas, sendo necessárias pesquisas relacionados à cascata de eventos, fatores e substâncias envolvidas na interface materno-embrionária durante este período em modelos animais (D' HAUTERIVE et al., 2002).

A implantação é um fenômeno que envolve a interação entre o embrião e o endométrio materno. Existe, no ciclo menstrual, um curto e preciso período de tempo no qual a interação materno-embrionária é ótima e culmina com a adesão e invasão do blastocisto no endométrio, induzido por secreção de progesterona (CAVAGNA; MANTESE, 2003). Este período de máxima receptividade uterina para que haja a implantação é denominado janela de implantação. Esta fase é manifestada pela expressão de peptídeos e proteínas que podem servir como biomarcadores da receptividade uterina (LESSEY, 2000). Na janela de implantação ocorrem mudanças morfológicas no epitélio endometrial caracterizadas pelo aparecimento de projeções de membrana chamadas pinopodes. Os pinopodes são organelas progesterona-dependentes semelhantes a protusões celulares apicais que aparecem entre os dias 20 e 21 de um ciclo menstrual normal (NIKAS

et al., 1995). O mecanismo de ação dos pinopodes ainda não é claro, mas eles podem promover a remoção do fluido uterino, facilitando a adesão do blastocisto nas suas moléculas (PSYCHOYOS; NIKAS, 1994). Sendo assim, o aparecimento dos pinopodes é útil para a avaliação do momento ótimo para a transferência embrionária e eles podem ser considerados potenciais marcadores biológicos da receptividade endometrial (NIKAS, 1999, 2000).

A receptividade endometrial pode ser definida como a capacidade da mucosa uterina em permitir o sucesso da implantação embrionária, sendo esta o processo pelo qual o embrião invade o endométrio, primeiro o epitélio, e depois vasos sanguíneos, formando a placenta. O endométrio é modificado por hormônios para começar a se tornar receptivo ao embrião (CAVAGNA; MANTESE, 2003).

Existem vários fatores que regulam as mudanças típicas da janela de implantação e o aparecimento dos pinopodes. A expressão materna e embrionária dos fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão celular, podem, também, ter um papel principal no fenômeno da implantação (CAVAGNA; MANTESE, 2003).

As citocinas (glicoproteínas regulatórias) têm função de mensageiros químicos, mas também servem como biomarcadores da receptividade uterina. O entendimento da função desses biomarcadores e seu papel na determinação da janela de implantação em mulheres, pode ser útil para diagnosticar e tratar casais inférteis mais eficientemente (CAVAGNA; MANTESE, 2003).

Citocinas e fatores de crescimento são derivados de polipeptídios e proteínas que têm a capacidade de se ligarem a receptores de superfície celular específicos e podem atuar como potentes ativadores de cascatas de sinalização intracelular, regulando funções de células endometriais. Eles regulam a proliferação celular, diferenciação e apoptose (GIUDICE, 1999).

Os eventos que ocorrem durante a janela de implantação envolvem também uma variedade de citocinas e a produção destas, juntamente com aquelas derivadas da população leucocitária presente no microambiente placentário, agem sinergicamente no estabelecimento da gravidez (MOUZON; GUERRE-MILLO, 2006).

Inúmeras funções são atribuídas às citocinas durante a gestação. Elas participam da manutenção do corpo lúteo, adesão e implantação do blastocisto no endométrio,

desenvolvimento placentário e fetal, diferenciações celulares e medeiam mecanismos imunes tolerantes ao conceito (SCHÄFER-SOMI, 2003).

Uma gestação normal é caracterizada por um estado imunológico preferencialmente Th2, quando citocinas anti-inflamatórias como Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL5), Interleucina-10 (IL10) e Fator de Crescimento Tumoral β (TGF- β) são produzidas por diferentes células, inclusive de natureza fetal. Qualquer disfunção desse estado imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), altamente prejudiciais à gestação (LUPPI, 2003; RAGHUPATHY, 2001). Segundo Lin e colaboradores (1993), IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 são sintetizadas na interface materno-fetal murina, principalmente por células da decidua e da placenta fetal em todo o período gestacional.

Estas citocinas Th2, como IL-10, são essenciais para a tolerância materna ao embrião já que exercem função anti-inflamatória e imunossupressora, inibindo a produção de citocinas desfavoráveis, além de inativar as funções dos monócitos/macrófagos e de células “Natural Killer” (NK), bem como inibir, direta ou indiretamente, células TCD8+ (WALL et al., 1991).

Existe uma população de células embrionárias que estão diretamente envolvidas com o processo de implantação, denominadas células trofoblásticas (FERRO, 1991). Em roedores, como *Calomys callosus*, que é um roedor da família Cricetidae encontrado nas Américas central e do sul, a implantação embrionária se dá por penetração, através de mecanismos de fagocitose realizados pelos trofoblastos e alojamento do embrião no endométrio. Assim, forma-se um adequado local para nutrição do embrião e seu concomitante desenvolvimento (FERRO et al., 1999). Nestes animais, a implantação do embrião é excêntrica em uma cripta uterina antimesometrial e evolui rapidamente para uma posição intersticial, graças à ação invasiva do trofoblasto, o qual envolve o blastocisto durante o evento da implantação assumindo diferentes comportamentos dependendo de sua localização (FERRO, 2000).

O trofoblasto mural, localizado nas paredes laterais do embrião, e o trofoblasto abembrionário, localizado no pólo oposto ao da massa celular interna, estão envolvidos com o processo de implantação embrionária. Estas células sofrem transformações gradativas e tornam-se células trofoblásticas gigantes, que apresentam como principal

característica a aquisição de capacidade invasiva e fagocitária (ILGREN, 1983; BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988; FERRO; BEVILACQUA, 1994).

As células trofoblásticas gigantes estão comprometidas com a invasão do epitélio uterino e do estroma endometrial com o propósito final de alcançar e romper vasos sanguíneos. Uma vez que o sangue materno passa a banhar a superfície destas células, estabelece-se uma superfície para trocas metabólicas entre o organismo da mãe e o embrionário. Esta interação trofoblasto-sangue materno tende a se tornar mais complexa e eficiente com a maturação da placenta. Antes da formação deste órgão, entretanto, a aquisição de nutrientes é também realizada por meio de uma intensa atividade fagocitária de elementos sanguíneos maternos (BILLINGTON, 1971).

O trofoblasto polar, que cobre a massa celular interna, se mantém como um centro proliferativo, fornecedor das células trofoblásticas (COPP, 1979), assume a forma de uma excrescência cônica que recebe o nome de cone ectoplacentário e contribui com a diferenciação de diversas populações celulares para a formação da placenta. Estas células trofoblásticas estão diretamente envolvidas em processos de implantação embrionária no endométrio. Depois de atravessar a camada epitelial uterina, o trofoblasto rapidamente se espalha tanto mesometrialmente quanto antimesometrialmente no estroma endometrial, fagocitando as células maternas remanescentes para contato e ruptura da vasculatura materna (FERRO et al., 2002).

Em roedores, as células epiteliais em contato com as células trofoblásticas invadidas, exibem desorganização severa e elas são removidas por fagocitose trofoblástica (FERRO et al., 1999). Particularmente em *C. callosus*, essa fase de invasão é muito precoce e o evento é rápido, durando aproximadamente 12 horas depois do início da implantação. Sempre em contato direto com sangue materno, depois de 9 dias de prenhez o trofoblasto polar diferencia e, junto com a decídua mesometrial, inicia o processo de placentação (FERRO et al., 2002).

A decídua materna é um tecido que se submete a rápidas mudanças morfológicas e funcionais, sugerindo que essas mudanças podem influenciar na natureza da resposta imune local na interface materno-embrionária nos diferentes estágios da gestação (KRUSE et al., 2002).

Durante o processo de implantação embrionária, o estroma endometrial sofre inúmeras alterações, que em conjunto são denominadas de reações decíduais. Inicialmente, ocorre um aumento da permeabilidade vascular (PSYCHOYOS, 1961) e a transformação gradativa de fibroblastos em células decíduais. Os fibroblastos tornam-se volumosos, com depósitos de lipídeos, retículo endoplasmático e Golgi proeminentes (ABRAHAMSON, 1983) e, apesar da origem conjuntiva, assumem formas poliédricas e arranjo epitelióide (KREHBIEL, 1937).

A primeira região do útero a sofrer decidualização é a região situada no lado oposto à inserção do mesométrio, denominada região antimesometrial. Na porção mesometrial, o processo de decidualização ocorre mais tardiamente e está intimamente relacionado com a formação da porção materna da placenta (FERRO, 2000).

Células decíduais possuem importante papel na contenção da invasividade trofoblástica (KIRBY; BRADBURY, 1965), secretam hormônios, fatores de crescimento, citocinas e peptídeos (GIBORI, 1994; KENNEDY, 1994).

Durante a gestação, o sistema imune materno normalmente apresenta um estado de tolerância frente aos antígenos fetais, já que a resposta imune periférica da mãe contra agentes infecciosos permanece eficaz neste período. Portanto, o estabelecimento de uma gestação é caracterizado por predominância de citocinas anti-inflamatórias que garantem o sucesso gestacional (ZENCLUSSEN, 2006).

A identificação de marcadores biológicos de receptividade uterina pode ter um significado clínico importante, por melhorar as taxas de implantação naturais e por promover contracepção eficiente. Um marcador biológico ideal da receptividade uterina deve possuir algumas características: tem que estar presente no endométrio, perto do sítio de implantação; tem que aparecer durante a janela de implantação e desaparecer depois deste período (ZHU et al., 1998).

Citocinas produzidas pela mucosa uterina e pelo embrião podem ter um papel na interação materno-embriônica, realçando a receptividade uterina pelo controle da expressão de proteínas de adesão e não-adesão (SIMÓN et al., 2000).

Entre as principais citocinas e fatores de crescimento que podem ter um papel na implantação humana por facilitar a receptividade endometrial estão: fator inibitório de

leucemia (LIF), interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento da heparina epiderme-ligante, fator colônia estimulante-1 (CSF-1), entre outros (GONZALEZ et al., 2001).

Segundo observações feitas por Lin e colaboradores (1993), o envolvimento predominante de citocinas Th2 é favorável à evolução da gestação inibindo um padrão de resposta Th1 e conseqüentemente conferindo manutenção e desenvolvimento embrionário. Citocinas Th2, como a IL-10, são essenciais para a tolerância materna ao embrião, já que é anti-inflamatória e imunossupressora.

Outro evento marcante relacionado ao sucesso da implantação embrionária consiste na aquisição de adesão aos ligantes junto com a perda de componentes inibitórios, os quais são cruciais para o estabelecimento da gravidez. Grande número de mediadores moleculares, além das citocinas, é identificado, incluindo moléculas de adesão, fatores de crescimento, lipídeos, lectinas e outros associados ao útero receptivo, sendo que há uma série de alterações morfológicas e glicoprotéicas durante a janela de implantação. Todos esses fatores e mediadores participam deste processo e seus ajustamentos estão relacionados com o processo da receptividade uterina (ACHACHE; REVEL, 2006).

Há outros tipos de células, relacionadas também com a receptividade uterina, que compõem a família das moléculas de adesão celular (CAM). Esta família é composta por quatro membros conhecidos: integrinas, catedrinas, selectinas e imunoglobulinas. A superfície ligante dessas moléculas, usualmente glicoproteínas, medeiam a adesão célula-célula, sendo que as suas funções clássicas incluem a manutenção da integração do tecido, cicatrização de feridas, movimentos morfogênicos, migração celular e metástase tumoral (ACHACHE; REVEL, 2006).

Glicoproteínas também estão presentes no processo da implantação embrionária, bem como durante todo o período gestacional e algumas, específicas da gravidez (PSGs), formam uma família altamente similar de proteínas produzidas pela placenta ao longo da gestação. PSGs homólogas foram identificadas em primatas e roedores, sendo que membros da família PSG murina e humana induzem secreção de citocinas anti-inflamatórias em fagócitos mononucleares (WATERHOUSE et al., 2002). PSGs são membros de uma família de antígenos carcinoembrionários (CEA) e em humanos, a concentração de PSG na circulação sanguínea aumenta exponencialmente ao longo do período gestacional (LIN et al., 1974). Baixos níveis de PSGs são associados às condições

patológicas da gestação, incluindo aborto espontâneo, crescimento intra-uterino retardado e preeclampsia (ARNOLD, et al., 1999; SILVER et al., 1993). Recentemente foi demonstrado que as PSGs humanas induzem IL-10, IL-7 e expressão de TGF β 1 em monócitos humanos (SNYDER et al., 2001). Isso sugere que as PSGs, ao induzir expressão e produção de citocinas Th2, desempenham papel protetor ao embrião, por dificultar reações inflamatórias no microambiente placentário (WATERHOUSE et al., 2002).

Um exemplo importante de glicoproteínas são as mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular que contêm no mínimo 50% dos carboidratos O-ligados à treonina/serina (GENDLER et al., 1990). Quando altamente expressado na superfície da célula, MUC-1 interfere na adesão celular.

A superfície apical da maioria das células epiteliais é protegida por um glicocálix composta, em sua maioria, por mucinas que, acredita-se, proteger a superfície celular de processos patológicos (STROUS; DEKKER, 1992). No endométrio, MUC-1 se estende através do glicocálix e é, provavelmente, a primeira molécula que o embrião encontra na sua rota de ataque. Uma possibilidade contemplada é que o MUC-1 endometrial repele o blastocisto até que este encontre o local e a hora exata para a implantação. A distribuição e regulação de MUC-1 variam durante o ciclo menstrual e entre as espécies (ACHACHE; REVEL, 2006).

Devido ao aumento de MUC-1 no endométrio no momento da implantação, suspeita-se que esse fator tem uma função crucial de guiar o embrião temporalmente e espacialmente para uma implantação efetiva. Essa teoria é consistente com o fato de que MUC-1 se estende além do glicocálix que cobre o endométrio e é a primeira molécula que encontra o blastocisto entrando na cavidade uterina (ACHACHE; REVEL, 2006).

Segundo Goldstein e colaboradores (1980), as lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam especificamente a carboidratos, com capacidade de aglutinar células ou precipitar conjugados. Embora as lectinas sejam conhecidas há mais de cem anos, a idéia de que elas possam mediar fenômenos biológicos pelo reconhecimento de moléculas é recente.

A nomenclatura das lectinas é originada da denominação científica das espécies em que são purificadas, de acordo com o protocolo de purificação, pela designação dos monossacarídeos aos quais têm especificidade ou ainda pela designação do tecido ao qual

foram extraídas, por exemplo, a lectina concanavalina A é uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis* e por isso recebe essa denominação (KENNEDY et al., 1995).

As lectinas, ou hemaglutininas, podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (LIS; SHARON, 1973; ASKAR, 1986). Algumas lectinas são específicas em suas reações com grupos sanguíneos humanos ABO e MN e subgrupo A1 (SHARON; LIS, 1972). Todos estes efeitos são produzidos pela habilidade das lectinas de se ligarem a tipos específicos de açúcares na superfície celular (DESHPANDE; DAMODARAN, 1990).

Além dessas propriedades, as lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (LIS; SHARON, 1973; LIENER, 1981). Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N- acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (NICOLSON, 1974; PEUMANS; VAN DAMME, 1996). A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas na área biológica e médica tais como: investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, como agentes mitogênicos, caracterização de estádios de desenvolvimento de microorganismos diversos, purificação de glicoproteínas, morfologia de neurônios e identificação de conexões neurais no sistema nervoso central (KENNEDY et al., 1995).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais, entretanto, estas substâncias estão presentes, em maior quantidade, em grãos de leguminosas e gramíneas (MANCINI FILHO et al., 1979; PUSZTAI, 1989).

As lectinas de mamíferos, por exemplo, medeiam as interações célula-célula envolvendo ligantes de carboidratos (POIRIER; ROBERTSON, 1993). O termo lectina (do latim *legere*, escolher) é usado genericamente desde sua primeira denominação por Boyd e Shapleigh (1954) e adotando as descrições das diferentes propriedades das lectinas, pode-se defini-las como: proteínas ligantes de carboidratos, não anticórpicas, não enzimáticas, que se ligam de modo reversível e específico a mono e oligossacarídeos.

Jacalina é uma lectina, ligante da manose, da semente do fruto da jaca, *Artocarpus integriflora*, que pertence a família das plantas Moraceae e se constitui de 2 cadeias

polipeptídicas, uma cadeia α pesada e uma cadeia β leve (MAHANTA et al., 1992; RUFFET et al., 1992). Análises de raio-X da estrutura cristalina da jacalina mostrou que essa lectina tem uma estrutura tetramérica de subunidades heterodímeras (α/β) e cada subunidade contém um único local carboidrato-ligante (SANKARANARAYANAN et al., 1996).

Concanavalina A (Con A) é outra lectina, ligante da D-galactose, obtida da fava de *Canavalia ensiformes*, e foi a primeira lectina de uma leguminosa reconhecida como uma proteína Glc/Man-específica (SUMMER; HOWELL, 1936). Con A é um monômero que compartilha com outras lectinas uma estrutura tridimensional muito similar e difere essencialmente por sua qualidade e modo de oligomerização (HARDMAN; AINSWORTH, 1972).

As lectinas não estão confinadas somente às plantas, mas podem ser encontradas amplamente na natureza, aparecendo freqüentemente na superfície de células, onde estão estrategicamente posicionadas para combinar com carboidratos de células vizinhas. De forma interessante, as lectinas distinguem-se não somente entre diferentes monossacarídeos, mas também diferentes oligossacarídeos (SHARON; LIS, 1983).

A especificidade das lectinas para as glicoproteínas depende tanto dos açúcares envolvidos quanto do acesso dos oligossacarídeos das cadeias. Oligossacarídeos O-ligados em proteínas de superfície celular proporcionam estruturas adequadas ao estabelecimento de interações celulares. São dois os tipos de oligossacarídeos conhecidos que se ligam às proteínas: oligossacarídeos N-ligados, que se iniciam com resíduos asparagina, e os O-ligados, que são de cadeias mais curtas, freqüentemente terminando em NGal ou ácido siálico e iniciados por resíduos de serina e treonina (VARKI et al.; 1999).

Interações lectina-carboidrato possuem um papel crucial na especificidade dos processos de adesão celular. Oligossacarídeos O-ligados em proteínas de superfície celular proporcionam estruturas adequadas ao estabelecimento de interações celulares (VARKI et al., 1999). É proposto por Jentof (1990) que a O-glicosilação proporcione às proteínas da superfície de células uma forma alongada, protuberante em relação ao glicocálix, podendo estender seus sítios ativos para interação com macromoléculas extracelulares ou de outras células, incapazes de penetrar a região da superfície celular.

As lectinas isoladas de plantas, animais, bactérias e fungos são de interesse biotecnológico devido ao seu papel como mediadoras em mecanismos de reconhecimento celular de muitos fenômenos biológicos como, migração celular, defesa imunológica e infecção por microorganismos. Sendo assim, despertam interesses científicos devido ao seu grande potencial, quando são utilizadas de forma purificada, em pesquisas biológicas para fins de diagnóstico clínico e investigação de estrutura de proteína e carboidratos em células (SILVA; SILVA, 2000).

Galectinas, também conhecidas como lectinas S-lac, compõem uma família bem definida de lectinas β -galactosidase-ligantes caracterizada por uma alta sequência homóloga nos domínios carboidrato-ligantes e estão presentes no útero de ratos (POWELL, 1980) e placentas humanas (HIRABAYASHI; KASAI, 1984). As lectinas S-Lac, recentemente chamadas galectinas (BARONDS et al., 1993), são caracterizadas pelo domínio altamente conservado da identificação dos carboidratos com preferência de ligantes para N-acetil-lactosamina e particularmente da estrutura repetida de poly-N-acetil-lactosamina (HIRABAYASHI; KASAI, 1984; BARONDS et al., 1994).

Para que ocorra a regulação de todos esses processos durante a implantação embrionária e placentação, é necessária e essencial a presença de grandes quantidades de galectinas no útero e placenta. Observações mostram que a galectina-1 é expressa em células trofoblásticas de ratos antes do estágio de blastocisto (POIRER et al., 1992).

A relação dessas proteínas para uma variedade de processos importantes, incluindo transformação neoplásica e invasividade tumoral, proliferação celular e interações célula-célula, célula-matriz e matriz-matriz, além da imunomodulação local tem, geralmente, sido atribuído à suas habilidades em reconhecer gliconjugados específicos pelo significado dos sítios de ligação (LIU, 1993).

A infertilidade primária se dá devido à falhas na implantação que podem estar associadas, também, com o polimorfismo das glicoproteínas, resultando em proteínas com redução substancial no número de sítios de O-glicosilação (HORNE et al., 2001).

1.2. Modelo Experimental *Calomys callosus*

A super família Muroidea abriga grande número de espécies de roedores que habitam todo o mundo e inclui as famílias Cricetidae (hamsters e *Calomys*) e Muridae

(ratos e camundongos). Alguns cricetídeos, especialmente os do hemisfério norte, mostram-se bastante adaptáveis, quando mantidos em cativeiros, 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 (GONZAGA; FERRO, 1995).

C. callosus é encontrado em diferentes tipos de biomas, como em floresta tropical, savana, caatinga, pastagem e área urbana, especialmente em regiões rurais (FERRO, 2000), e têm sido utilizado como modelo experimental na toxoplasmose congênita (FERRO, 2000; BARBOSA et al., 2007) e na saúde pública por servirem como reservatório para *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* e *leishmania* spp. (FAVORETO-JR et al., 1998).

Em termos reprodutivos *C. callosus* são animais poliétricos e possuem um ciclo estral de aproximadamente seis dias e um período gestacional de cerca de 22 dias. O processo de implantação embrionário inicia-se no 4º dia de gestação e ocorre de forma mais rápida do que o observado em outros roedores (FERRO, 1991; MELLO, 1978).

1.3. Útero de *Calomys callosus*

C. callosus, assim como outros roedores, possui placenta do tipo hemocorial, ou seja, o córion é diretamente banhado por sangue materno, semelhante ao observado na espécie humana (CARLSON, 1996; RUGH, 1967).

A placenta destes animais possui três regiões típicas: camada decidual, zona juncional e zona do labirinto. A primeira região é de origem materna e só há presença de sangue materno. Já na zona juncional e na zona do labirinto há tanto sangue materno quanto fetal (FERRO, 2000; RUGH, 1967).

O útero é composto de dois cornos, um corpo e uma cérvix, e as proporções relativas de cada parte, assim como a forma e disposição dos corpos, variam de espécie para espécie (HAFEZ, 1988). Em outras palavras, o útero tem a forma de um “Y” com uma haste bem curta (RUGH, 1967). A parede uterina é constituída por três túnicas, que, de fora para dentro, são: serosa (tecido conjuntivo + epitélio) ou adventícia (somente tecido conjuntivo) de acordo com a região do órgão considerada; miométrio (uma túnica de músculo liso) e o endométrio que é uma mucosa que possui epitélio simples cilíndrico,

revestindo a luz, e secreta muco na superfície e também nas glândulas da lâmina própria do endométrio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O endométrio, assim como seus fluidos, apresenta grande relevância no processo reprodutivo como, por exemplo, transporte dos espermatozóides do local da ejaculação até o local de fertilização na tuba, controle da função do corpo lúteo, início da implantação, gestação e parto (RODRIGUES, 1996). À medida que os espermatozóides são transportados através da luz uterina para as tubas eles começam a sofrer a capacitação nas secreções endometriais (HAFEZ, 1988).

Indiretamente, a secreção do colo do útero desempenha um importante papel na fertilização. Durante a ovulação as glândulas do colo uterino secretam muco muito fluído, o que facilita a passagem dos espermatozóides. Na fase secretora e na gravidez, os elevados níveis sanguíneos de progesterona influenciam essas glândulas a produzirem muco viscoso, o que impede a passagem de microrganismos e de espermatozóides para dentro da cavidade uterina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disso, o útero tem a capacidade de sofrer modificações extraordinárias no tamanho, devido a síntese de colágeno que as células musculares lisas fazem, estrutura e posição com o intuito de se adequar às necessidades do produto em crescimento sendo que a resposta contrátil do mesmo permanece quiescente até o momento do parto, quando, então, tem a participação mais destacada para a expulsão fetal, sendo que, após o parto, readquire seu antigo tamanho e condição através de um processo denominado involução (HAFEZ, 1988).

Além das inúmeras funções desempenhadas pelo útero, ele é um órgão altamente especializado e adaptado para aceitar e nutrir o embrião desde a implantação até o parto. Sabe-se que após a implantação, o embrião irá depender de um suprimento vascular adequado, dentro do endométrio, para seu desenvolvimento (RODRIGUES, 1996). Em *C. callosus* toda a rede de eventos e interações protéicas ligadas previamente e/ou durante o processo de implantação ainda não foi descrita.

Não é possível, por razões práticas e éticas, estudar a fisiologia da implantação em humanos, devido a essa impossibilidade de estudo, modelos animais são necessários para que se possa decifrar os eventos mecânicos e moleculares da janela de implantação.

Devido à complexidade desses eventos, é notório e necessário o desenvolvimento de trabalhos que possibilitem maior compreensão sobre o assunto. Pelo fato de *C. callosus*

serem considerados excelentes modelos experimentais para diversas situações descritas na literatura (FERRO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 1995; BARBOSA et al., 2007), por simularem o que ocorre em humanos, no caso de algumas doenças, e pela fácil manutenção e manuseio destes animais em laboratório, torna-se viável um estudo que possibilite a análise e/ou identificação de glicoproteínas presentes no epitélio uterino quando este se torna receptivo para o embrião e observar possíveis alterações morfológicas durante o processo de implantação embrionária.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo analisar as alterações morfológicas e bioquímicas no epitélio uterino de *C. callosus* durante a implantação embrionária e etapas que antecedem este evento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizadas seis fêmeas de *C. callosus* (linhagem Canabrava), com cerca de três meses de idade oriundas do biotério do Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Uberlândia onde são mantidos com água e ração granulada *ad libitum*, complementada com semente de girassol, milho e aveia.

3.2. Acasalamento e detecção de prenhez

Fêmeas virgens de *C. callosus* foram colocadas nas gaiolas dos machos na proporção de duas fêmeas para cada macho. Todos os dias, pela manhã, as fêmeas foram observadas para verificar se havia presença da rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). Quando esta era detectada, considerava-se o primeiro dia de gestação.

A partir do primeiro dia de gestação, contou-se os dias de prenhez de modo a obter fêmeas no 3º, 4º e 5º dias de gestação, totalizando 6 fêmeas (2 para cada idade gestacional).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

3.3. Coleta do material

Fêmeas prenhes foram sacrificadas do 3º ao 5º dia de gestação. Os animais foram anestesiados com o uso de 0,1 ml de uma mistura (1:1) de cetamina (Ketalar, Bayer S. A., São Paulo) e 2% de cloridrato de 2-(2,6 xilidino)- 5,6-dhidro- 4H – 1,3- tiazina (Rompun,, Bayer S. A., São Paulo), e, posteriormente, deslocamento cervical. Feito isso, os animais foram laparatomizados para remoção do útero. O material coletado foi processado para análise morfológica e histoquímica. Após fixação e processamento, o material era cortado e depositado em lâminas histológicas. Cada lâmina continha em torno de seis cortes, sendo que foram preparadas mais de 15 lâminas por animal e destas, três para análise morfológica e três para histoquímica.

3.4. Processamento do material para análise morfológica

Para análise ao microscópio de luz, as amostras de útero foram fixadas em formol a 10% em tampão PBS 0,1M, pH 7,4, por 18 horas e processadas rotineiramente para inclusão em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Suécia). Cortes de 2 μ m foram depositados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina. As lâminas foram então analisadas e fotografadas em um microscópio trilocular Zeiss, modelo Axiolab, MC 80.

3.5. Processamento do material para estudo histoquímico

Para análise ao microscópio de luz, as amostras foram fixadas em formol 10% em tampão PBS 0,1M, pH 7,4 por 18 horas e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes de 4 μ m foram depositados em lâminas recobertas com albumina. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente e processados para estudo histoquímico.

3.5.1. PAS (Periodic Acid Schiff)

O mecanismo da reação PAS atinge o grupamento alfa glicol dos polissacarídeos que se transformam em dialdeídos pelo ataque do agente oxidante. É uma oxidação rápida realizada por um agente muito empregado, que é o ácido periódico. A oxidação pelo ácido periódico sobre os grupamentos 1-2 glicol, produzindo grupamentos aldeídos, funciona para substâncias como, ácido hialurônico, fibrina, glicoproteínas do conjuntivo, fungos, polissacarídeos de bactérias, ceróides e em certas células de algumas doenças.

Para esta análise, as lâminas, desparafinizadas, foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, oxidou-se os cortes em ácido periódico a 0,4% em temperatura ambiente durante dois minutos. Novamente efetuou-se a lavagem em água corrente por 10 minutos, seguidas por três mergulhos em água destilada. Feito isso, o corante reativo de Schiff foi usado por 30 minutos (1,5 g de fucsina básica e 200 ml de água destilada). Este reativo foi preparado dissolvendo a fucsina em 200 ml de água destilada agitando durante

10 minutos seguido de fervura. Após resfriamento da mistura em temperatura ambiente, foi acrescentado 9g de metabissulfito de sódio seguido de agitação e repouso por 30 minutos, posteriormente seguiu-se com a filtração e adição de 30 ml de HCl 1 normal –recém preparado- gota a gota, agitando a mistura. O reativo foi mantido overnight na geladeira a 4°C. Em seguida, foram realizados três banhos de água sulfurosa (10 ml de metabissulfito de sódio a 10% ; 10 ml de HCl e 180 ml de água) por 30 segundos seguidos de lavagem em água corrente por dez minutos e passagem por três vezes em água destilada. Corou-se com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. As lâminas foram desidratadas, montadas e posteriormente observadas ao microscópio de luz.

3.5.2. Detecção de glicoproteínas utilizando lectinas biotiniladas

As lectinas Jacalina e Concanavalina A foram marcadas com biotina de acordo com o seguinte protocolo: 250 µg de N-hidroxisuccinida-biotina (Sigma Chemical Co., EUA) foram adicionados a 1 mg de cada lectina diluída em tampão borato de sódio 0,1 M (ph 8,8). A mistura foi incubada por 4 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta. Em seguida, 20 µL de solução de NH₄Cl a 1 M foram adicionados para cada 250 µg de biotina e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. As lectinas marcadas foram dialisadas contra PBS para remover a biotina não ligada, com pelo menos seis trocas durante 48 horas e armazenadas a – 20°C até o momento do uso.

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e procedeu-se o bloqueio da fosfatase endógena por imersão da lâmina em solução de ácido acético glacial 10% em água destilada por 10 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada e em tampão Tris salina (TBS), as lâminas foram incubadas com jacalina biotinilada ou concanavalina A biotinilada por uma hora a 37°C na diluição de 1:50.

Após este tempo, as lâminas foram lavadas em TBS e incubadas em um complexo de amplificador com sistema Avidina/Biotina (Biomeda, Foster, City, USA) por 40 minutos. Após este período, as lâminas foram tratadas com fast red-naftol (Sigma, St. Louis, USA) por cinco minutos e contracoradas com hematoxilina de Mayer por mais 5 minutos. Feito isso, as lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio trilocular Zeiss, modelo Axiolab, MC 80.

3.6. Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo a coleta do material biológico, utilização dos reagentes e dos equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais, foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança segundo Chaves-Borges; Mineo (1997).

4. RESULTADOS

Não foram observadas alterações morfológicas no epitélio uterino, nos materiais provenientes das fêmeas de 3º, 4º e 5º dias de gestação. A presença do embrião foi notada a partir do 4º dia de gestação, sendo que nesta fase este se encontrava no útero com nítida presença da massa celular interna (mci) e trofoblasto (T) circundando a blastocele. Morfologicamente o embrião apresentou-se sob a forma de blastocisto e observou-se um acúmulo de células indiferenciadas constituindo a massa celular interna. A parede do blastocisto foi vista formada por células trofoblásticas justapostas recobrimdo a superfície externa da mci e da blastocele. A interface materno-embrionária caracterizou-se por uma íntima justaposição entre as células trofoblásticas e epiteliais uterinas (E) (Fig. 1).

O embrião foi também visualizado, nas lâminas provenientes do 5º dia de gestação, no endométrio, sendo nítido o processo de decidualização.

As marcações positivas na superfície do epitélio uterino, confirmadas pela reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS), demonstram a presença de glicoproteínas nas três idades gestacionais, sendo que a quantidade de glicoproteínas expressadas aumentou progressivamente do 3º para o 4º dia de gestação, com decréscimo nas lâminas de fêmeas provenientes do 5º dia gestacional. Foi observado no 3º dia gestacional a presença destas glicoproteínas intracelularmente (Fig. 2a), enquanto no 4º e 5º dias, estas se apresentam na superfície celular (Fig. 2c, e), com expressão acentuada no 4º dia gestacional (Fig. 2c).

As marcações específicas para açúcares manose e D-galactose, observadas pela histoquímica, revelaram menor quantidade de açúcares nos epitélios uterinos de fêmeas do 3º dia de gestação (Fig. 2b) e aumento acentuado no 4º e 5º dias gestacionais (Fig. 2d, f). No entanto, esta técnica apresentou resultados positivos somente para a concanavalina A, lectina ligante do açúcar D-galactose, sendo negativa para a jacalina, lectina ligante do açúcar manose, indicando, para esta situação, que apenas a D-galactose esteve envolvida com os processos da implantação embrionária.

4.1. Legendas e documentação fotográfica

FIGURA 1: Embrião de 4º dia de gestação.

Fotomicrografia mostrando o embrião na fase de blastocisto em contato com o epitélio uterino (E). Observar um acúmulo de células indiferenciadas constituindo a massa celular interna (mci) e a blastocele (*) revestidas pela camada de células trofoblásticas (T) e a decídua materna (d). Observar as células trofoblásticas em estreita proximidade com o epitélio uterino (►). Azul de Toluidina, 430X.

FIGURA 2: Histoquímica para marcações de glicoproteínas (PAS) e marcações específicas para D-galactose.

Fotomicrografia mostrando marcações positivas da reação do ácido periódico de Schiff no material proveniente de fêmeas do 3º dia de gestação. Observa-se a presença de glicoproteínas intracelulares no epitélio uterino (fig. 2 a ►) e também a presença de pouca quantidade de D-galactose na superfície epitelial detectada pela lectina concanavalina A (fig. 2 b ►). No material proveniente de fêmeas do 4º dia de gestação observa-se um aumento acentuado de glicoproteínas, que foram marcadas pelo PAS, no epitélio uterino (fig. 2 c ►), bem como um aumento acentuado de D-galactose na superfície do epitélio uterino (fig. 2 d ►). No material proveniente de fêmeas do 5º dia de gestação observa-se uma diminuição relativa de glicoproteínas marcadas pelo PAS (fig. 2 e ►), bem como aumento de D-galactose na superfície do epitélio uterino (fig. 2 f ►).
Figuras 2 a, e, f: Hematoxilina de Mayer, 430X. Figuras 2 b, c, d: Hematoxilina de Mayer, 170X.

Figuras 2 b,d, f: Histoquímica usando fosfatase alcalina e fast red naftol contracorado com hematoxilina de Mayer.

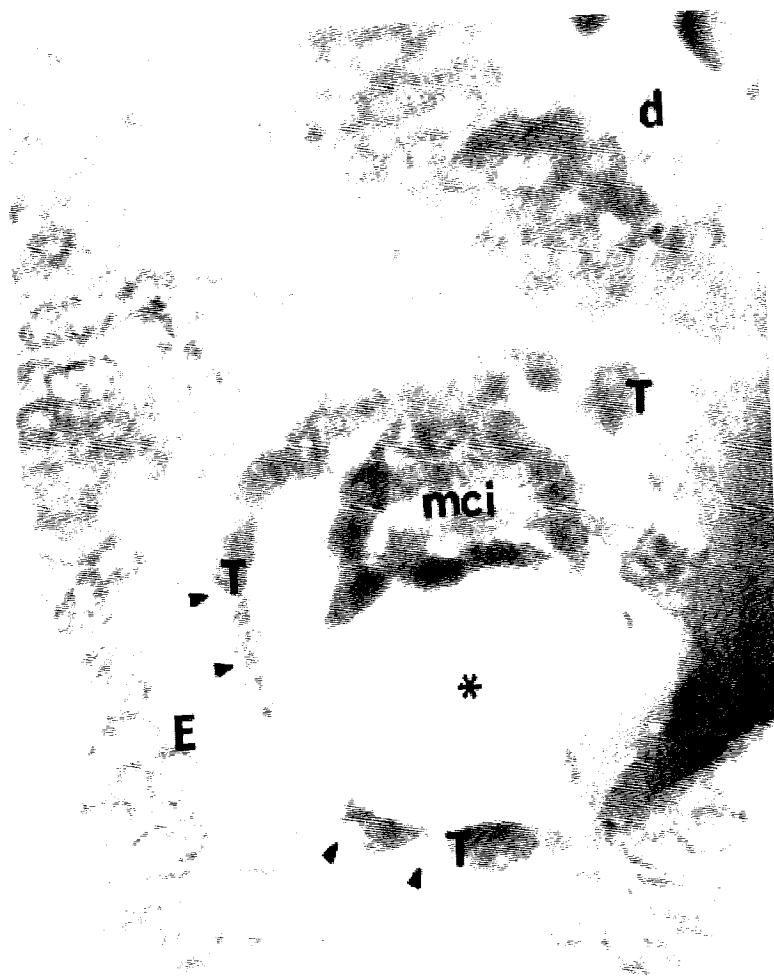


Figura 1

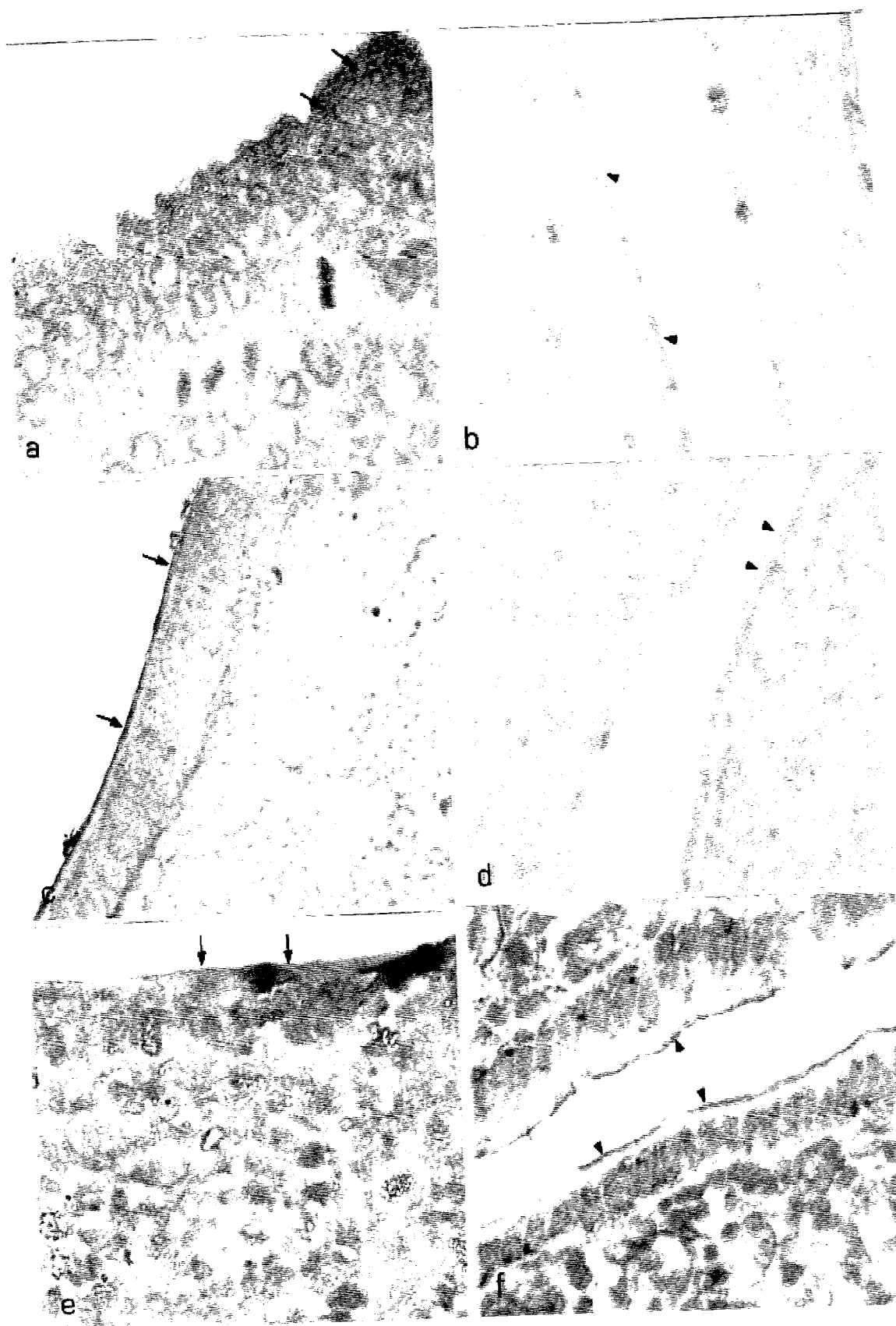


Figura 2

5. DISCUSSÃO

O processo da implantação embrionária requer tanto a participação do embrião quanto do endométrio, culminando com a aposição e adesão do blastocisto no endométrio durante a janela de implantação e a invasão do trofoblasto numa fase secretora posterior. Portanto, a interação entre o embrião e o endométrio é caracterizada por um diálogo molecular, com a participação de citocinas, fatores de crescimento, hormônios e moléculas de adesão celular, como glicoproteínas e açúcares, as quais podem funcionar como marcadores biológicos da receptividade endometrial e desenvolverem importantes papéis nas etapas precoces da gestação, bem como atuarem como potentes sinais intracelulares (mediadores das interações celulares) (SIMON et al., 2000).

No presente estudo, os materiais provenientes de fêmeas do 3º dia de gestação não apresentaram nenhuma alteração, em termos morfológicos, do epitélio uterino. Nesta fase ainda não houve a implantação embrionária, portanto, não foi localizada, também, a presença do embrião. Diferentemente, no 4º dia gestacional ocorreram algumas alterações devido à presença do embrião, sendo que neste pôde ser observada a presença da massa celular interna no interior da blastocle. Dados semelhantes foram descritos por Ferro (1991) num estudo ultra-estrutural das fases iniciais da implantação embrionária em *C. callosus*, onde na manhã do 4º dia de gestação, os embriões na fase de blastocisto, encontravam-se livres no lúmen da cripta uterina e nenhuma relação de contato com o organismo materno foi observada, já na tarde deste mesmo dia, embrião e epitélio uterino aproximaram-se mantendo um tênue contato entre as superfícies apicais das células trofoblásticas e epiteliais, caracterizando a fase de aposição, aproximação gradativa dos organismos materno e embrionário de modo que o contato entre trofoblasto e epitélio uterino torne-se progressivamente mais complexo. Esta aproximação evoluiu para uma fase de adesão na medida em que um estreito contato se estabeleceu entre estes dois organismos, sendo que nesta fase, extensas áreas de membranas das células trofoblásticas mantiveram estreita proximidade com as membranas apicais das células epiteliais.

Ocorrida a adesão do embrião ao epitélio uterino, inicia-se o processo de invasão do epitélio uterino pelo trofoblasto nas laterais da cripta uterina em contato com o embrião, como foi descrito por FERRO (1991) na noite do 4º dia de gestação.

Neste trabalho, as lâminas provenientes de fêmeas do 5º dia de gestação, também apresentaram alterações, uma vez que o embrião já se encontrava no epitélio uterino, além de ser nítido o contato do trofoblasto com o endométrio. Neste dia o embrião foi observado no endométrio apresentando blastocle mais ampla e maior densidade de células compondo a massa celular interna. Ferro (1991) observou, nesta fase, que prolongamentos de células trofoblásticas penetram por entre as células decíduais de aspecto normal, apesar do compacto arranjo desta estrutura e da quantidade de junções apresentadas por elas. Para Sutherland et al. (1988), o processo de invasão do estroma endometrial e de vasos sanguíneos pode ser atribuído à expressão de receptores específicos na superfície das células trofoblásticas, capazes de se ligarem a glicoproteínas da matriz extra celular e da lâmina basal.

Durante a janela de implantação notou-se a presença de glicoproteínas PAS positivas em pequena quantidade no 3º dia de gestação, aumentando acentuadamente no 4º dia e diminuindo relativamente no 5º dia gestacional. Isso pode ser devido ao fato de que estas moléculas desempenhem importantes papéis durante a implantação embrionária, como, por exemplo, proteger a superfície celular de processos patológicos, repelir o blastocisto até que este encontre o local e a hora exata para a implantação, bem como guiar o embrião temporalmente e espacialmente para uma implantação efetiva e interferir na adesividade celular (STROUS; DEKKER, 1992). Além disso, esses resultados foram consistentes com o que foi observado por Zhu et al. (1998), onde um marcador biológico ideal da receptividade uterina deve possuir algumas características como estar presente no endométrio perto do sítio de implantação; aparecer durante a janela de implantação e desaparecer após este período. Para Carson e colaboradores (1998), as glicoproteínas não só protegem o trato reprodutivo de processos patogênicos, mas desempenham uma função essencial no processo reprodutivo propriamente dito.

Estudos recentes indicam que as glicoproteínas constituem uma larga proporção de componentes dispostos apicalmente na mucosa do trato reprodutivo. As mucinas transmembranas são encontradas através do trato reprodutivo de fêmeas de muitas espécies. Segundo Carson e colaboradores (1998), é possível que as mucinas tenham sua estrutura alterada durante a conversão para o estado receptivo uterino para que elas possam se ligar especificamente à receptores de oligossacarídeos da superfície do blastocisto, entretanto, a

expressão destas mucinas é diferentemente controlada nas diversas respostas hormonais dos tecidos reprodutivos de fêmeas, indicando a presença de fatores específicos.

A implantação embrionária é um processo complexo que exige receptividade máxima do endométrio ao embrião para que este possa se aderir, penetrar e finalmente invadir o estroma endometrial. Em termos moleculares, a receptividade do endométrio resulta na aquisição de ligantes ou de receptores que facilitem este processo (D'HAUTERIVE et al., 2002; ACHACHE; REVEL, 2006; CAVAGNA; MANTESE; 2003).

Os resultados da histoquímica para marcações de açúcares indicaram que a presença do açúcar manose na superfície uterina é ínfima ou então ausente diferentemente, a expressão de D-galactose foi observada no útero no período da janela de implantação, sendo que no 3º dia gestacional a quantidade foi pequena, aumentando acentuadamente no 4º e 5º dias gestacionais. Este resultado indica possível desempenho deste açúcar no processo da implantação embrionária. Entretanto, até o momento não existe nenhuma definição molecular precisa da janela de implantação e nenhuma teoria elaborada sobre os estudos realizados *in vitro*, sendo que estes não podem nos dar uma idéia satisfatória da cascata exata dos fatores de crescimento, citocinas ou moléculas de adesão na interface materno-embrionária nem mesmo sobre mecanismos de tolerância ao feto.

Os marcadores propostos participam do processo da implantação e podem ser positivos (permissivos) ou negativos (inibitórios), mas sabe-se que estão presentes na superfície do epitélio endometrial e desempenham um papel significativo dentro das fases que compreendem a aposição e adesão do blastocisto. Provavelmente a D-galactose seja uma dessas glicoproteínas de importância fundamental no processo de implantação embrionária. Chavez e Anderson (1985), através do uso de lectinas, relataram o aparecimento de sítios de D-galactose no epitélio uterino durante o período de pré-implantação, sugerindo que o aparecimento de receptores para estas moléculas na parede do blastocisto poderia estar mediando a adesão entre trofoblasto e epitélio uterino. Não obstante, estudos adicionais são necessários para entender a ação dessas moléculas na receptividade endometrial e para determinar realmente sua função neste processo.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que marcações positivas da reação PAS para glicoproteínas foram encontradas nas três idades gestacionais, com uma quantidade razoável no 3º dia de gestação, aumento notável no 4º dia e diminuição relativa no 5º dia gestacional, confirmando o fato de que as glicoproteínas desenvolvem funções importantes durante o período da janela de implantação.

Os resultados da histoquímica para marcações de açúcares indicam que a presença do açúcar manose na superfície uterina é ínfima ou ausente, enquanto que o açúcar D-galactose está presente no útero no período da janela de implantação, sendo que no 3º dia de gestação a quantidade é pequena, aumentando acentuadamente no 4º e 5º dias gestacionais, demonstrando a participação deste açúcar no processo de implantação embrionária.

Além disso, foi verificado que *C. callosus* é um bom modelo experimental para o estudo da expressão de glicoproteínas, principalmente Con A, por representar o que a literatura demonstrou acerca destas moléculas em estudos anteriores. Entretanto, estudos mais detalhados sobre os eventos envolvidos no processo de implantação em *C. callosus* ainda são necessários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAMSON, P. A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomic Embryology**, v.166, p.263-274, 1983.

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction**, v.12, p.731-46, 2006.

APLIN, J. D. The cell biological basis of human implantation. **Clinical Obstetric Gynaecology**, v.14, p.757-764, 2000.

ARNOLD, L. L.; DOHERTY, T. M.; FLOR, A. W.; SIMON, J. A.; CHOU, J. Y.; CHAN, W. Y.; MANSFIELD, B. C. Pregnancy specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potencial correlation to interleukin-10 expression. **American Journal Reproduction Immunology**, v.41, p.174-182, 1999.

ASKAR, A. Faba beans (*Vicia faba* L.) and their role in the human diet. **Food and Nutrition Bulletin**, v.8, p.15-24, 1986.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v.28, p.624-630, 2007.

*Segundo normas da ABNT 2002.

BARONDS, S. H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D. N. W. CUMMINGS, R. D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M. A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K.; LEFFLER, H.; LIU, F. T.; LOTAN, R.; MERCURIO, A. M.; MONSIGHY, M.; PILLAI, S.; POIRER, F.; RAZ, A.; RIGHY, P. W. J.; RINI, J. M.; WANG, J. L. Galectins: a family of β -galactoside-binding lectins. **Cell**, v.76, p.597-598, 1993.

BARONDS, S. H.; COOPER, D. N. W.; GITT, M. A.; LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal Biology Chemistry**, v.269, p.20807-20810, 1994.

BEVILACQUA, E. M.; ABRAHAMSON, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **Journal Morphology**, v.198, p.341-351, 1988.

BILLINGTON, W. D., Biology of trophoblast. **Advance Reproduction Physiology**, v.5, p.27-66, 1971.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipiting activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v.119, p.419, 1954.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**, p.84-95, 1996.

CARSON, D. D.; DESOUZA, M. M.; KARDON, R.; ZHOU, X.; LAGOW, E.; JULIAN, A. Mucin expression and function in the female reproductive tract. **Human Reproduction**, v.4, p.459-464, 1998.

CAVAGNA, M.; MANTESE, J. C. Biomarkers of Endometrial Receptivity – A Review. **Placenta**, v.24, p.39-47, 2003.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança**, Uberlândia: EDUFU (editora UFU). p.55, 1997.

CHAVEZ, D. J.; ANDERSON, T. L. The glycocalix uterine luminal epithelium estrus, early pregnancy, the peri-implantation period and delayed implantation. I. Acquisition of *Ricinus communis* I binding sites during pregnancy. **Biology Reproduction**, v.32, p.1135-1142, 1985.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios éticos na experimentação animal**, p.1, 1991.

COPP, A. J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm. II. The fate the polar trophectoderm. **Journal Embryology Experimental Morphology**, v.51, p.109-120, 1979.

DENKER, H. W. Implantation: a cell biological paradox. **Journal Experimental Zoology**, v.266, p.541-558, 1993.

D'HAUTERIVE, P. S.; CHARLAT-RENARD, C.; GOFFIN, F.; FOIDART, M.; GEENEN, V. La fenêtre implantatoire. **Journal Gynecology Biology Reproduction**, v.31, p.440-455, 2002.

DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.10, p.147-241, 1990.

FAVORETO-JR, S.; FERRO, E. A. V.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 130-107, 1998.

FERRO, E. A. V. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. 1991. 132 f. Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal Morphology**, v.221, p.139-152, 1994.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitology Research**, v.85, p. 647-654, 1999.

FERRO, E. A. V. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147 f. Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.70, p.7089-7094, 2002.

GENDLER, S. J.; LANCASTER, C. A.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; DUHIG, T.; PEAT, N.; BURCHELL, J.; PEMBERTON, L.; LALANI, E. N.; WILSON, D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. **Journal Biology Chemistry**, v.265, p.15286-15293, 1990.

GIBORI, G. The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A.; eds., **Endocrinology of Embryo – Endometrium Interactions**, p. 217-222, 1994.

GIUDICE, L. C. Potencial biochemical markers of uterine receptivity. **Human Reproduction**, v.14, p.3-16, 1999.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.

GONZAGA, J. O.; FERRO, E. A. V. **Invasão decidual pelo trofoblasto durante a implantação embrionária em *Calomys callosus***. 1995. Monografia de bacharelado – Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1995.

GONZALEZ, R. R.; DEVOTO, L.; CAMPANA, A.; BISCHOF, P. Effects of leptin, interleukin-1 alpha, interleukin-6 and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. **Endocrine**, v.15, p.157-164, 2001.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia funcional da reprodução feminina. *In*: **Reprodução animal**, v. 4, p.32-69, 1988.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4. Å resolution. **Biochemistry**. v.11, p.4910-4919, 1972.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. Human placenta β -galactoside-binding lectin. Purification and some properties. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.122, p.938-944, 1984.

HORNE, A. W.; WHITE, J. O.; MARGARA, R. A.; WILLIAMS, R.; WINSTON, R. M.; LALANI, E. MUC 1: a genetic susceptibility to infertility? **Lancet**, v.357, p.1336-1337, 2001.

ILGREN, E. B. Review article: Control of trophoblast growth. **Placenta**, v.4, p.307-328, 1983.

JENTOF, N. Why are proteins O-glycosylated? v. 15, p. 291-294, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. *In: Histologia básica*, 10ª. ed, p.367-388, 2004.

KENNEDY, T. G. Involvement of local mediators in blastocyst implantation. *In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A.; eds., Endocrinology of Embryo – Endometrium Interactions*, p.183-194, 1994.

KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.26, p.219-230, 1995.

KIRBY, D. R. S.; BRADBURY, S. The hemochorial of mouse placenta. *Anatomical Record*, v.152, p.279-282, 1965.

KREHBIEL, R. H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiology Zoology*, v.10, p.212-238, 1937.

KRUSE, A.; MARTENS, N.; FERNEKORN, U.; HALLMANN, R.; BUTCHER, E. C. Alterations in the Expression of Homing-Associated Molecules at the Mteral/Fetal Interface Durinhg the course of pregnancy. *Biology Reproduction*, v.66, p.333-345, 2002.

LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. *In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods*, p.143-157, 1981.

LESSEY, B. A. The role of the endometrium during embryo implantation. *Human Reproduction*, v.15, p.39-50, 2000.

LIN, T. M.; HALBERT, S. P.; SPELLACY, W. N. Measurement of pregnancy associated plasma proteins during human gestation. *Journal Clinical Investigation*, v.54, p.576-582, 1974.

- LIN, H.; MOSMANN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S.; WEGMANN, T. G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **Journal Immunology**, v.151, p.4562-4573, 1993.
- LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, v.42, p.541-574, 1973.
- LIU, F. T. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. **Immunology Today**, v.14, p.486-490, 1993.
- LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine**, v.21, p.3352-3357, 2003.
- MAHANTA, S. K.; SANKER, S.; RAO, N. V. S. A. V. P.; SWAMY, M. J.; SUROLIA, A. **Biochemistry Journal**, v.284, p.95-101, 1992.
- MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M.; VIZEU, D.M. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. **Journal of Food Science**, v.44, p.1194-1196, 1200, 1979.
- MELLO, O. A. Biology of *Calomys callosus* (RENGGER, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, p.807-811, 1978.
- MOUZON, S. H.; GUERRE-MILLO, M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. **Placenta**, v.27, p.794-798, 2006.
- NAVOT, D.; SCOTT, R. T.; DROESCH, K.; VEECK, L. L.; LIU, H. S.; ROSENWAKS, Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. **Fertil Sterility**, v.55, p.114-118, 1991.

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, v.39, p.89-190, 1974.

NIKAS, G. Pinipodes as markers of endometrial receptivity in clinical practices. **Human Reproduction**, v.14, p.99-106, 1999.

NIKAS, G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. **Reproduction Medicine**, v.18, p. 229-235, 2000.

NIKAS, G.; DRAKAKIS, P.; LOUTRADIS, D.; NARA-SKOUFARI, C.; KOUMANTAKIS, E.; MICHALAS, S.; PSYCHOYOS, A. Uterine pinipodes as markers of “nidation window” in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. **Human Reproduction**, v.10, p.1208-1213, 1995.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A. D.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L. S.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, v.27, p.691 – 698, 1995.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, v.7, p.132-138, 1996.

POIRER, F.; TIMMONS, P. M.; CHAN, C. T. J.; GUÉNET, J. L.; RIGBY, P. W. J. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggest multiple roles during pre and post implantation development. **Development**, v.115, p.143-155, 1992.

POIRIER, F.; ROBERTSON, E. J. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. **Development**, v.119, p.1229-1236, 1993.

POWELL, J. T. Purification and properties of lung lectins. **Biochemistry Journal**, v.187, p.123-129, 1980.

PSYCHOYOS, A.; NIKAS, G. Uterine pinipodes as markers of uterine receptivity. **Assisted Reproduction**, v.4, p.26-32, 1994.

PSYCHOYOS, A. Permeabilité capillaire et decidualisation utérine. **Academy Science Paris**, v.252, p.1515-1517, 1961.

PUSZTAI, A. Lectins. *In*: CHEEK, P.R. **Toxicants of plant origin: proteins and aminoacids**, v.3, p.29-71, 1989.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1 / Th2 / Th3 paradigm. **Seminars Immunology**, v.13, p.219-227, 2001.

RODRIGUES, J. F. T. **Alterações cíclicas do epitélio vaginal durante o ciclo estral em *Calomys callosus***. 1996. 53 f. Monografia – Centro de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1996.

RUFFET, E.; PAQUET, N.; FRUTIGER, S.; HUGHES, G. J.; JATON, J. C. **Biochemistry Journal**, v.286, p.131-134, 1992.

RUGH, R. **The mouse: its reproduction and development**, p.88-101, 1967.

SANKARANARAYANAN, R.; SEKAR, K.; BANERJEE, R.; SHAMA, V.; SUROLIA, A.; VIJATAN, M. **Nature Structure Biology**, v.3, p.596-603, 1996.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.73-94, 2003.

SHARON, N., LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v.177, p.949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins receptors as lymphocyte surface markers. **Advance Immunology**, v.34, p.213-298, 1983.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Nutrition**, v.13, p.3-9, 2000.

SILVER, R. M.; HEYBORN, K. D.; LESLIE, K. K. Pregnancy specific beta 1 glycoprotein (SP-1) in maternal serum and amniotic fluid; pre-eclampsia, small for gestational age fetus and fetal distress. **Placenta**, v.14, p.583-589, 1993.

SIMON, C.; MARTIN, J. C.; PELLICER A. Paracrine regulators of implantation. **Clinical Obstetry Gynaecology**, v.14, p.815-826, 2000.

SNYDER, S.; WESSNER, D.; WESSELLS, J.; WATERHOUSE, R.; WAHL, L. M.; ZIMMERMANN, W.; DVEKSLER, C. Pregnancy specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 e TGF- β 1 by human monocytes. **American Journal Reproduction Immunology**, v.45, p.205-216, 2001.

STROUS, G.J.; DEKKER, J. Mucin-type glycoproteins. **Biochemistry Molecular Biology**, v.27, p.57-92, 1992.

SUMMER, K. D.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal Bacteriology**, v.32, p.227-237, 1936.

SUTHERLAND, A. E.; CALARCO, P. G.; DAMSKY, C. H. Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. **Journal Cell Biology**, p.1331-1348, 1988.

VARKY, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. eds. **Essentials of Glicobiology**, p. 85-114, 1999.

ZENCLUSSEN, A. C. Regulatory T cells in pregnancy. **Seminars Immunology**, v.28, p.31-39, 2006.

ZHU, L. J.; BOVE, C. K.; POLIHRONIS, M.; BAGCHI, M. K.; BAGCHI, I. C. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. **Endocrinology**, v.139, p.3923-3935, 1998.

WALL, M. R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G; VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an immunoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal Experimental Medicine**, v.174, p.1209-1220, 1991.

WATERHOUSE, R.; HA, C.; DVEKSLER, G. S. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. **Journal Experimental Medicine**, v.195, p.277-282, 2002.