

JÚLIO DE MELLO NETO

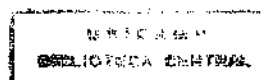
**AÇÃO DA INDOMETACINA SOBRE O
CONTEÚDO LIPÍDICO DAS CÉLULAS
DECIDUAIS DE CAMUNDONGOS:**

**ESTUDO HISTOQUÍMICO E
MORFOMÉTRICO.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração em MORFOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon

Campinas/SP
1998



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M489a
V.	Ex.
TI-MBO BC/	35076
PROC.	395/98
C	☐ ☒ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/09/98
N.º CPDR/MCC	115970-0

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Mello Neto, Júlio de

M489a Ação da indometacina sobre o conteúdo lipídico das células
deciduais de camundongos: estudo histoquímico e morfométrico/
Júlio de Mello Neto. --Campinas, SP: [s.n.], 1998.
111f.:ilus.

Orientadora: Maria do Carmo Alberto-Rincon

Colaboradora: Iara Maria Silva de Luca

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

I. Lipídeos. 2. Camundongos. 3. Histoquímica. I. Alberto-Rincon,
Maria do Carmo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Mônica e Heitor,

*O melhor de mim estará sempre com
você. Sempre.*

*“Per amore
Hai mai fatto niente
Solo per amore
Hai sfidato il vento e urlato mai
Diviso il cuore stesso
Pagato e riscommesso
Dietro questa mania
Che resta solo mia”*

Mariella Nava

Agradecimentos

A Deus. E que eu possa ser perdoado pelos animais sacrificados para este estudo... E que eles estejam em paz...

Aos meus pais, Villa e Yaya, por sempre acreditarem em meus projetos de vida, com muito amor.

À minha orientadora, Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon, pela serenidade e equilíbrio com que conduziu este projeto.

À Cintia Sade de Patro, por ter dado os primeiros passos deste projeto com tanta seriedade.

Aos técnicos Baltazar Pereira de Paula, Cleuza de Oliveira Franco, Mariba Marques de Almeida e Maria Israel Prataolera. Às secretárias Rita de Cássia Messias Fávoro, Vânia Aparecida Baroni Fontana e Helena Regina Gomes. À bióloga Antônio Maria Ferreira Lima. Profissionais extremamente competentes, essenciais em todas as etapas deste trabalho, o que o foram com muita amizade.

Às grandes amigas Patrícia Aline Boer-Lima, Patrícia Dourado Costa e Cristiane Regina Corrêa da Silva Melo. Porque as maiores conquistas da vida seriam vazias sem afeto.

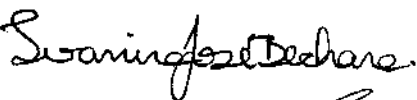
Aos professores Dr. Armando Mânco de Camargo, Dra. Joatira José Bechara e Dra. Fátima Böttcher-Luiz, pelas valiosas sugestões.

À Dra. Vilma Cloris de Carvalho, pelo entusiasmo contagiante com que faz Ciência.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alberto-Rincon 

Prof^a. Dr^a. Ivanira José Bechara 

Prof. Dr. Armando Mâncio de Camargo 

Suplente: Prof^a Dr^a. Fátima Böttcher-Luiz 

ÍNDICE

RESUMO

1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3- MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1- OBTENÇÃO DE ANIMAIS	20
3.2- ACASALAMENTO	20
3.3- TRATAMENTO	21
3.4- OBTENÇÃO DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA	21
3.5- PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS	23
3.5.1- Técnica para detecção de lípidos totais (Sudan black)	23
3.5.2- Técnica para detecção de fosfolípidos contendo colina	24
3.5.3- Graduação da intensidade das diferentes reações para detecção de lípidos	27
3.6- PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	27
3.6.1- Microtomia	29
3.6.2- Contrastação	30
3.6.3- Avaliação do volume relativo (fração de volume) ocupado pelas gotículas lipídicas	30
3.7- PROCESSAMENTO PARA PARAFINA	32
3.7.1- Avaliação da espessura das diferentes camadas componentes do sítio de implantação embrionária	33

3.8- TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	34
4- RESULTADOS	35
4.1- RESULTADOS HISTOQUÍMICOS	35
4.1.1- Região de decídua madura	35
4.1.2- Região de células pré-decíduais	37
4.1.3- Região de estroma não decidualizado	38
4.2- RESULTADOS QUANTITATIVOS	39
4.2.1- Avaliação morfométrica das camadas constituintes do sítio de implantação embrionária	39
4.2.2- Avaliação do volume relativo	41
5- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	43
6- DISCUSSÃO	56
7- CONCLUSÕES	65
8- ABSTRACT	66
9- BIBLIOGRAFIA	68

RESUMO

A finalidade deste projeto foi analisar o comprometimento de gotículas lipídicas e dos fosfolípidos como precursores de prostaglandina nas células decíduais. Para tanto, 40µl de 25mg de indometacina solubilizado em óleo de gergelim foram injetados intraperitonealmente em fêmeas no quinto dia de gestação (DDG). Animais-controle receberam o mesmo volume de óleo de gergelim. Os animais foram sacrificados no sétimo DDG. As amostras foram subdivididas e parte delas foi fixada em solução de formalina contendo 3% de HgCl₂ ou em formalina contendo CaCl₂. Cortes de congelação foram processados para reação histoquímica para detecção de fosfolípidos contendo colina (FCC) ou para Sudan Black. Outra parte dos sítios de implantação embrionária foi fixada com glutaraldeído a 2% em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% sob tratamento em microondas e processados para inclusão em resina epoxi.

As análises morfométricas realizadas em sítios de implantação embrionária fixados em Bouin e corados com HE mostraram que o tamanho dos úteros tratados com indometacina

é menor do que os não tratados. Ao microscópio óptico a reação decidual foi menos proeminente no endométrio dos animais tratados.

A histoquímica para FCC mostrou forte reação nas células deciduais e menor intensidade nas células pré-deciduais. Resultado semelhante foi observado com a reação para Sudan Black. Quando comparadas as intensidades de reação dos animais não-tratados e tratados, estes mostraram reação mais intensa para FCC e para Sudan Black.

As análises ultra-estruturais mostraram maior quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma de células deciduais dos animais tratados com indometacina do que nos controles. Estes resultados sugerem efetiva ação da indometacina na reação decidual e alteração do metabolismo lipídico. O grande acúmulo de lípidos nas células deciduais sugerem que o conteúdo lipídico poderia estar envolvido na biossíntese de prostaglandinas.

1- INTRODUÇÃO

O endométrio de camundongos é constituído por um epitélio cilíndrico simples, sustentado por um tecido conjuntivo frouxo típico, composto por células tipo fibroblastos, leucócitos e material extracelular . A sincronia existente entre o estágio de desenvolvimento do blastocisto e a receptividade do endométrio determina o sucesso da implantação embrionária. É, portanto, necessário que mudanças hormônio-dependentes tenham se estabelecido no endométrio e que o conceito tenha alcançado o estágio de blastocisto (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Com a implantação do blastocisto, o estroma endometrial sofre uma série de modificações, levando à formação de um novo tecido dentro do ambiente uterino, a decídua (Krehbiel, 1937). A decídua se forma em muitos grupos de mamíferos, entre estes os humanos e roedores. Esta estrutura é resultado de profundas modificações no estroma endometrial, envolvendo tanto os componentes celular quanto os da matriz extracelular. O conjunto desses fenômenos é conhecido como reação decidual ou decidualização (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

O início da decidualização ocorre quando células classificadas, morfológicamente, como fibroblastos “like” transformam-se em células volumosas, poliédricas, poliplóides denominadas células deciduais. Ultraestruturalmente, as células deciduais mostram grande aumento de organelas, como retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi, mitocôndrias e lisossomos (Jollie & Bencosme, 1965; Moulton & Blaha, 1978; Brokelmann & Biggers, 1979; Parr et al., 1986; Abrahamsohn, 1989; Abrahamsohn & Zorn, 1993); acumulam lípidos, glicogênio e filamentos intermediários em seu citoplasma, constituídos principalmente pela proteína desmina (Glasser & Julian, 1986; Glasser et al., 1987; Zorn et al., 1990). O grande número de organelas das células deciduais capacita-as a secretarem prolactina (Krug et al., 1983), colágeno tipo IV e prostaglandinas (Kennedy, 1983, 1985).

Estas células estabelecem junções dos tipos “gap” e “adherens” (Parr et al., 1986; Tung et al., 1986), o que é bastante incomum entre células de tecido conjuntivo. As junções do tipo

“gap”, neste caso, são tidas como mediadoras de uma permeabilidade seletiva a componentes sanguíneos na decídua primária, com um possível papel imunoprotetor ao embrião, uma vez que neste período este é circundado por células epiteliais maternas, e ainda não possui suas próprias camadas protetoras (Kennedy, 1990).

A reação decidual é deflagrada quando ocorre uma adesão do blastocisto ao epitélio uterino, desde que os animais estejam sensibilizados hormonalmente, estado fisiológico denominado “janela de implantação”(Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Em camundongos, a decidualização tem início no quinto dia de gestação na região imediatamente abaixo da cripta onde o blastocisto está se implantando, ou seja, é antimesometrial e subepitelial. Inicialmente, as células subepiteliais adjacentes à câmara embrionária se decidualizam, gradativamente a reação decidual avança centrifugamente (Abrahamsohn & Zorn, 1993), atingindo as camadas mais profundas do endométrio, causando assim uma regionalização do estroma uterino, conforme o estágio

de decidualização em que se encontram as células: 1- decídua madura ou primária, com células plenamente decidualizadas, justapostas, com pouco material extracelular, situadas próximo à câmara embrionária; 2- região de células pré-decíduais ou decídua secundária, onde as células estão parcialmente decidualizadas com muitos prolongamentos e que deixam amplos espaços intercelulares entre si; e finalmente, 3- região de estroma não decidualizado, composto por células fusiformes com longos prolongamentos, situadas próximo ao miométrio. Acredita-se que esta última camada mantém-se inalterada, isto é, com fibroblastos típicos, pois irá reconstituir o endométrio logo após o parto (Kleinfeld & O'Shea, 1983).

A decidualização pode ocorrer também em resposta a estímulos artificiais químicos ou mecânicos, desde que os animais estejam hormonalmente sensibilizados (Psychoyos, 1973; Finn and Porter, 1975; Kennedy, 1980; Kennedy & Lukash, 1982). A decidualização, neste caso, processa-se de maneira semelhante àquela com estímulo do blastocisto, e o estroma endometrial

também apresenta-se com três regiões como as anteriormente mencionadas.

A formação da decídua é acompanhada de uma marcante redução dos espaços intercelulares o que consequentemente, envolve uma extensa remodelação dos componentes da matriz extracelular. Vários estudos têm mostrado a ocorrência de modificações na matriz extracelular do endométrio durante a gestação. Zorn et al. (1986) relataram a existência de flutuações na quantidade de fibrilas colágenas durante a gestação, além da ocorrência de fagocitose de colágeno. Em 1989, Alberto-Rincon et al. apresentaram resultados importantes que mostraram aumento acentuado da espessura de fibrilas de colágeno no endométrio decidualizado. As fibrilas mais espessas (aproximadamente 420nm) foram observadas na região de decídua madura.

O estímulo deciduogênico e sua manutenção, muito estudados por diversos autores, permanecem ainda pouco claros. Várias substâncias foram propostas como sendo indutoras do processo de decidualização, dentre elas pode-se citar a histamina

(Shelesnyak, 1952), fator ativador de plaquetas (Acker et al., 1989) e as prostaglandinas (Kennedy, 1983, 1985, 1986). Lejeune et al. (1981) sugerem que as células epiteliais seriam as transdutoras dos estímulos decíduogênicos iniciais, justificando assim o avanço centrífugo do processo. Esses mesmos autores demonstraram que o epitélio uterino desempenha papel importante na decidualização, uma vez que não houve implantação do blastocisto em úteros desprovidos de epitélio.

As prostaglandinas são classificadas como mediadores da inflamação da fase tardia e pertencem a uma família de lipídeos bioativos derivados de fosfolípidos de membrana e de corpos lipídicos citoplasmáticos (Dvorak et al., 1983; Alberto-Rincon et al., 1994). Estas substâncias não são estocadas, e sim sintetizadas e liberadas imediatamente por diversos tipos celulares.

Com exceção das células vermelhas do sangue, todas as células dos mamíferos sintetizam prostaglandinas (PGs) (Devlin, 1994). As prostaglandinas mais estudadas, por apresentarem maior papel biológico em humanos, são as prostaglandinas E_2

(PGE_2) e a $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$). As PGs também vem sendo implicadas com processos reprodutivos (Kennedy, 1985).

Foi verificado que, no momento da implantação embrionária, a concentração de prostaglandinas está aumentada em homogeneizados uterinos de ratas grávidas e pseudográvidas (Fenwick et al., 1977; Kennedy, 1983, 1985). Sananès et al. (1976) obtiveram resposta decidual proeminente com a administração intrauterina de prostaglandinas. Em contrapartida, com a administração de indometacina, um potente antiinflamatório não esteróide e inibidor da síntese de prostaglandinas (Vane, 1971), a resposta decidual foi reduzida ou atrasada, ou ainda impossibilitou a implantação dos embriões (Sananès et al., 1976; Philips & Poyser, 1981; Keys & Kennedy, 1990).

Estudos histoquímicos realizados por Alberto-Rincon et al. (1994), demonstraram no citoplasma das células deciduais maduras, quantidades significativas de corpos que são positivos às reações para detecção de fosfolípidos contendo colina e lípidos

totais. As células pré-decíduais também apresentaram o mesmo padrão, enquanto que as células do estroma não decidualizado foram negativas para estas reações. Estes dados mostraram que os fosfolípidos contendo colina são encontrados somente nas células do estroma decidualizado, ou em decidualização, mostrando a íntima relação desses lipídeos com a reação decidual. Os mesmos autores correlacionaram estes achados com a síntese de prostaglandinas pelas células decíduais.

Considerando-se, então, a hipótese de que os corpos lipídicos citoplasmáticos encontrados no endométrio sejam a fonte precursora das prostaglandinas, propusemos a administração de um inibidor da síntese de prostaglandinas, a indometacina (IM), a camundongos fêmeas grávidas no quinto dia de gestação, período em que o embrião já está implantado e portanto, a reação decidual em desenvolvimento.

No sétimo dia de gestação, período em que a decídua encontra-se em seu desenvolvimento máximo, o conteúdo lipídico das células submetidas ao tratamento com indometacina foi

estudado através de métodos histoquímicos para detecção de lípidos totais e de fosfolípidos contendo colina (Hadler & Silveira, 1978). Os sítios de implantação foram também avaliados morfometricamente, quanto ao seu diâmetro e ao tamanho de suas regiões. Além disso, foi efetuado estudo morfométrico ultraestrutural das gotículas lipídicas presentes nas células decíduais.

Este estudo teve o objetivo de avaliar o comprometimento do conteúdo lipídico de células decíduais com a síntese de prostaglandinas e indiretamente ressaltar a importância destes eicosanóides para a magnitude da reação decidual, da qual depende o sucesso da implantação do embrião no útero.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os fosfolípides são compostos de uma ou mais moléculas de ácidos graxos diversos, um radical fosfato e em geral uma base nitrogenada.

Os fosfolípides são importantes constituintes das lipoproteínas sendo essenciais para a formação de algumas delas. São também importantes doadores de radicais fosfato quando esses são necessários para diferentes reações químicas nos tecidos. Classicamente, a grande função atribuída aos fosfolípidos é na participação de elementos estruturais, principalmente nas membranas das células de todo organismo (Guyton, 1989).

Porém, desde que ficou claro que a quebra de fosfoinosítídeos (uma outra espécie de fosfolípides), pode liberar segundos mensageiros capazes de efetuar mudanças nas células, os fosfolípides passaram a ser alvo de maiores estudos em diversos centros de pesquisa.

O mecanismo de transdução dos fosfoinosítídeos é único no sentido de que a ativação do receptor leva à produção de mensageiros: 1, 4, 5 inositol-trifosfato (IP3) e 1, 2 diacilglicerol (DAG) cada um dos quais por sua vez, separada ou

conjuntamente, leva à produção ou mobilização de outros mensageiros e moduladores (Rana & Hokin, 1990).

Os dois braços desta via exercem sua influência por fosforilação de compartimentos distintos de proteínas-alvo: DAG agindo via proteína quinase C (PKC) e Ca^{++} agindo via calmodulina (Rana & Hokin, 1990).

O IP3 é considerado a molécula que se liga a um receptor para a mobilização de Ca^{++} dos estoques intracelulares (Rana & Hokin, 1990). Experimentos de fracionamento celular e experimentos com o uso de inibidores metabólicos revelam que o IP3 libera Ca^{++} do retículo endoplasmático (Biden et al., 1984; Joseph et al., 1984; Streb et al., 1984; Carstem & Miller, 1985; O'Rourke et al., 1985). No entanto, a quantidade total de Ca^{++} varia conforme o tecido sob investigação (Rana & Hokin, 1990).

A proteína quinase C, ativada por DAG, que pode influenciar vários processos celulares por fosforilação de várias proteínas, está também envolvida na atenuação da resposta fosfoinositídica por si mesma (Rana & Hokin, 1990). Para maiores detalhes ver Kikkawa & Nishizuka, 1986.

Investigações nos últimos anos revelaram que a PKC existe como uma família de múltiplas espécies com subcaracterísticas individuais (Coussens et al., 1986, 1987; Knopf et al., 1986; Parker et al., 1986; Ohno et al., 1987; Woodgett & Hunter, 1987).

Essas subespécies de PKC, sob elevada concentração de Ca^{++} podem ser ativadas por uma grande concentração de araquidonato na ausência de fosfolípide (Rana & Hokin, 1990).

Liberação aumentada de araquidonato e subsequente síntese de eicosanóides parecem estar relacionadas com resposta de fosfoinosítídeos em vários tecidos (Lapetinga et al., 1981; Putney, 1981; Litosch et al., 1982; Dixon & Hokin, 1984; Majerus et al., 1984), desde que a ativação de receptor, que controla a quebra de fosfoinosítídeos, também resulte na liberação de araquidonato e/ou eicosanóides.

Já foi demonstrado que o fosfatidilinositol (PI) é rico em araquidonato na posição 2 do glicerol (Michell, 1975; Majerus et al., 1988), no pâncreas (Keenen & Hokin, 1964; Banschbach et al., 1981), em plaquetas (Mahadevapa & Holub, 1983, 1984), na íris

(Yousufzai & Abdel-Latif, 1984) e em outros tecidos de mamíferos.

Dependendo do agonista e do tipo de tecido envolvido, muitos mecanismos para a liberação de araquidonato parecem existir.

Uma via implica na ação sequencial da DAG lipase e da monoacilglicerol (MAG) lipase sobre o DAG liberado de fosfoinosítídeos. Essa via parece ocorrer em plaquetas (Rittenhouse, 1982; Majerus et al., 1984) e em lóbulos pancreáticos (Dixon & Hokin, 1984).

Outra via que tem sido implicada na liberação de araquidonato é a quebra de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI), pela fosfolipase A₂, em plaquetas (Bills et al., 1977; Billah et al., 1980; Broekman et al., 1980; Van Den Bosch, 1980; Rittenhouse, 1982; Rubin, 1982; Mahadevapa & Holub, 1984).

Além dos fosfoinosítídeos, PC e PE são também esterificados com araquidonato em vários graus (Rana & Hokin, 1990).

Outra fonte de araquidonato são os alquilacilfosfolípides. Em plaquetas de ratos (Colard et al., 1986), a estimulação com trombina mostrou perda de araquidonato de diacil-sn-glicerol-3-fosfoinositol (PI) e de alquiacil e diacil-sn-glicerol-3-fosfocolina.

Kennerly (1987) demonstrou que, em mastócitos estimulados, metade da fração incrementada de DAG é derivada de lípidos não fosfoinositídeos. Fontes não fosfoinositídicas de DAG também tem sido reportadas em vários outros sistemas, como em células Ha-ras transformadas por oncogenes (Lacal et al., 1987); mitogênese induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos de hamster (Magnaldo et al., 1986) dentre outros (Farese et al., 1987; Rosoff et al., 1988).

Desde que ficou estabelecido que a hidrólise de fosfoinositídeos pode servir como um potente modulador das funções celulares, esse mecanismo recebeu muita consideração, embora tais lípides compreendam menos de 10% dos fosfolípides celulares totais. No entanto, por contribuírem com grande porcentagem à renovação celular total dos fosfolípides, os fosfoinositídeos foram as primeiras espécies onde verificou-se que,

uma vez quebradas liberavam segundos mensageiros (Rana & Hokin, 1990).

Entretanto, alguns dados sugerem que, em alguns tecidos, agonistas ativam a quebra fosfodiesterásica de PC liberando DAG (Besterman et al., 1986).

Em experimentos com homogeneizados de decídua uterina humana, a maior fonte de liberação de ácido araquidônico foi a fosfatidilcolina (Schrey et al., 1987). Nesse estudo, as células deciduais foram pré-tratadas com ester forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). O TPA liga e ativa a PKC, ocupando o lugar do DAG e tem sido utilizado como método de estudo do papel da PKC quando do metabolismo de fosfoinosítídeos (Rana & Hokin, 1990). Schrey et al. (1987) demonstraram que a redistribuição do ácido araquidônico foi indicativo de uma via hidrolítica, envolvendo mais a quebra de fosfolípides do que a hidrólise de triglicérides, sendo que a maior espécie envolvida foi PC e PI. Nesse estudo, o TPA também estimulou a produção de DAG; fato concordante com a hidrólise de PC mediada pela fosfolipase C, desde que o TPA não teve efeito

na produção de inositol-fosfatos. Além do mais, o TPA estimulou o acúmulo de MAG nas células decíduais, tanto quanto o de ácido araquidônico. Esses autores interpretaram tal fato como evidência que a renovação rápida do DAG originado de PC poderia contribuir para a maioria do ácido araquidônico mobilizado do PC em resposta ao TPA.

Tais observações são concordantes com o trabalho de Okazaki et al. (1981_a), que notaram a presença de DAG lipase em homogeneizados de decídua uterina humana. Os resultados são consistentes com a proposição que, na decídua, a sequência de reações levando à liberação do ácido araquidônico da posição sn-2 do 1,2 diacil-sn-glicerol, ocorreria como se segue: o ácido graxo da posição sn-1 é hidrolizado numa reação catalizada pela DAG lipase, seguida pela clivagem hidrolítica do ácido graxo da posição sn-2 pela MAG lipase. Um fato interessante nesse trabalho refere-se à atividade dessas enzimas no tecido decidual, que foi significativamente superior que à apresentada no âmnio e cório, tecidos também estudados.

Em resumo:

1º - Tratamento com TPA implicou na liberação de ácido araquidônico (Schrey et al., 1987).

2º - Tratamento com TPA implicou no aumento da liberação de DAG de PC pela fosfolipase C (Schrey et al., 1987).

3º - Existência da DAG lipase em células decíduais maduras (Okazaki et al., 1981_a).

4º - Hidrólise do DAG liberado de PC pela ação sequencial da DAG lipase e da MAG lipase (Okazaki et al., 1981_a).

5º - Liberação de ácido araquidônico do DAG (Okazaki et al., 1981_a; Schrey et al., 1987).

Essas evidências acumulam-se no sentido de que os fosfolípides com colina poderiam possuir um papel a desempenhar nas células decíduais.

É conceito corrente que, na maioria dos tecidos, a síntese de eicosanóides é limitada pela disponibilidade do precursor, ácido araquidônico livre (Lands & Samuelsson, 1968; Vonkeman & Van Dorp, 1968; Irvine, 1982).

O araquidonato, uma vez não esterificado, pode sofrer a ação de enzimas lipoxigenase e cicloxigenase. Os metabólitos da

via cicloxigenase são as prostaglandinas (PG), tromboxanos e prostaciclina e os da via lipoxigenase são os leucotrienos e os ácidos hidroxielicosatetraenóicos (HETEs).

Dentre os vários metabólitos do ácido araquidônico, as Prostaglandinas nos interessam de perto, considerando a célula decidual, já que a mesma secreta colágeno (Alberto-Rincon et al., 1989) e prostaglandinas (Kinohita et al., 1977; Okazaki et al., 1981 b; Moncada et al., 1987).

A taxa de liberação do ácido araquidônico a partir de glicerofosfolípidos (ou simplesmente fosfolípidos) é considerada o maior determinante da taxa de síntese das PGs (Lands & Samuelsson, 1968).

Em ovinos, Flint et al. (1986) propuseram que a estimulação da síntese endometrial de PGs por ocitocina estaria ligada ao aumento da hidrólise de PI para DAG e inositolfosfatos, com subsequente liberação de ácido araquidônico do DAG. Nesse trabalho, é postulado que esse seria o mecanismo para produção de PGF₂ alfa, já que o metabolismo estimulado de PI contribuiu para o efeito da ocitocina na síntese de PG no endométrio.

No entanto, esses mesmos autores acreditam que o uso de PI como substrato para a síntese de PG esperaria envolver mais o uso de lípides estocados do que aqueles presentes nas membranas celulares, desde que quando utilizado para a síntese de PGs, o DAG produzido da quebra de fosfoinosítídeos se torna inviável para reciclar o fosfatidilinositol. A síntese de PGs poderia então depletar a membrana celular, a menos que um estoque de lípides fosse utilizado (Flint et al., 1986).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção de Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos da linhagem "Swiss", de idade aproximada de 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia/UNICAMP à temperatura controlada de 22° a 23°C e em regime de luz de aproximadamente 12 horas. Os camundongos machos foram separados individualmente em gaiolas forradas com maravalha, recebendo água e ração comercial "ad libitum". As fêmeas foram mantidas em grupos de 20, em gaiolas maiores, recebendo o mesmo tratamento dado aos machos.

3.2 - Acasalamento

As fêmeas foram colocadas na presença de macho na proporção 3:1 e a cada manhã foi observada a presença do tampão vaginal, indicativo do acasalamento. O dia da constatação

do tampão vaginal foi considerado como sendo o primeiro dia da gestação (DDG).

3.3 - Tratamento

Vinte animais prenhes no quinto dia de gestação foram divididos em dois grupos de dez animais: tratado e controle. Cada fêmea do grupo de animais tratados recebeu intraperitonealmente, 0,2mg de indometacina (Sigma, Sigma Chemical CO., USA) diluída em 0,04mL de óleo de gergelim por volta das dez horas da manhã (Kennedy, 1977).

As fêmeas do grupo controle receberam, também por volta das dez horas da manhã, o mesmo volume (0,04mL) de óleo de gergelim.

3.4- Obtenção dos Sítios de Implantação Embrionária

Todas as fêmeas foram sacrificadas na manhã do sétimo dia de gestação, através de anestesia profunda por inalação de éter. Após a laparotomia, os úteros foram removidos e o tecido adiposo adjacente retirado.

Os sítios de implantação embrionária foram separados e fixados em diferentes soluções fixadoras, conforme a técnica a ser realizada:

- a) Trinta e um sítios de implantação embrionária de animais tratados com indometacina e 31 controles, foram fixados em formalina contendo 3% de cloreto de cálcio para detecção de lípidos totais pela técnica de Sudan Black.
- b) Trinta e oito sítios de animais tratados com indometacina e 30 controles, foram fixados em formalina contendo 3% de bicloreto de mercúrio para detecção de fosfolípidos contendo colina (Hadler & Silveira, 1978).
- c) Seis sítios de animais tratados com indometacina e 6 controles foram fixados em glutaraldeído 2% para inclusão em resina epon e posterior análise volumétrica relativa do conteúdo lipídico.

d) Dezesete sítios de animais tratados com indometacina e 17 controles foram fixados em solução de Bouin para inclusão em parafina e posterior obtenção de cortes histológicos, corados com HE para avaliações morfométricas.

3.5 - Procedimentos Histoquímicos

3.5.1 - Técnica Sudan Black: para Detecção de Lípides Totais (McManus & Mowry, 1960)

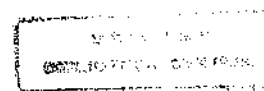
O material, fixado em formalina contendo 3% de cloreto de cálcio, foi lavado em água destilada por quinze minutos (três trocas de cinco minutos cada), congelado com CO₂ e cortado em micrótomo de congelação (Jung Heidelberg, Germany). Foram obtidos cortes transversais de aproximadamente 12µm e estes submetidos a técnica histoquímica de Sudan Black para detecção de lípidos totais descrita como se segue:

- os cortes foram colocados em solução alcoólica (60%), saturada e filtrada de Sudan Black por vinte a sessenta minutos. Esse procedimento foi efetuado em recipientes fechados.
- os cortes foram transferidos para recipientes contendo etanol 50%, por alguns segundos.
- posteriormente montados entre lâmina e lamínula com gelatina glicerizada.

3.5.2- Técnica para Detecção de Fosfolípidos Contendo Colina (Hadler & Silveira, 1978)

Os cortes de 12 μ m obtidos também em micrótomo de congelação (Jung Heidelberg, Germany), de sítios de implantação embrionária fixados em formalina contendo 3% de bicloreto de mercúrio foram submetidos à reação histoquímica para detecção de fosfolípidos contendo colina (Hadler & Silveira, 1978), como se segue:

- os cortes foram lavados em água destilada durante trinta minutos (três trocas de dez minutos).
- a seguir, foram transferidos para recipientes contendo solução de desoxicolato de sódio a 5% contendo 10% de peróxido de hidrogênio em água destilada por um período de 18 a 20 horas, à temperatura ambiente.
- lavagem em água destilada durante trinta minutos (três trocas de dez minutos) à temperatura ambiente.
- tratamento com ácido fosfomolibdico a 1% em etanol 50% durante cinco minutos à temperatura ambiente.
- lavagem em água destilada durante quinze minutos (três trocas de cinco minutos) à temperatura ambiente.
- tratamento com EDTA 1% durante cinco minutos à temperatura ambiente.
- lavagem com água destilada durante dez minutos (duas trocas de cinco minutos) à temperatura ambiente.



- tratamento com ácido perclórico a 5% durante vinte minutos à temperatura ambiente.
- lavagem com água destilada durante dez minutos (cinco trocas) à temperatura ambiente.
- evidenciação do produto de reação pela solução de difenilcarbazida a 0,8% em etanol a 95% durante dez minutos à temperatura ambiente.
- lavagem em etanol 60% durante um minuto à temperatura ambiente.
- lavagem com água destilada à temperatura ambiente.
- montagem entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada.

3.5.3- Graduação da Intensidade das Diferentes reações para detecção de Lípidos

Para quantificar-se a intensidade das reações para detecção de lípidos totais e de fosfolípidos contendo colina, adotou-se uma escala de intensidade de reação representada por cruces; + (uma cruz), correspondendo a uma reação fraca e ++++ (quatro cruces), à reação mais intensa.

3.6- Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

O material destinado para a microscopia eletrônica foi fixado por imersão em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,5M, pH 7,2 em forno de microondas doméstico (modelo NN 7809-BH; Panasonic do Brasil Ltda., Brasil), com 35 pulsos de 1 segundo à potência média. Em seguida, foi utilizado o seguinte protocolo:

- lavagem em salina glicosada (três trocas de 5 minutos).
- pós-fixação por imersão em tetróxido de ósmio 1% e salina na proporção 1:1 em microondas, com 35 pulsos de um segundo cada à potência média.
- lavagem em salina glicosada (três trocas de 10 minutos).
- desidratação em gradiente de etanol (50, 70, 80, 95, e 100%), com 2 banhos de 10 minutos em cada.
- álcool 100% e óxido propileno na proporção 1:1 em recipiente de vidro na capela por 10 minutos.
- óxido de propileno, 2 banhos de 10 minutos.
- mistura de resina epon e óxido propileno na proporção 1:1 por uma hora.
- resina epon pura, em agitação constante por 16 horas.

- inclusão em resina epon a 60°C para polimerização (48 horas).

3.6.1- Microtomia

Os blocos obtidos através deste protocolo foram trimados sob microscópio estereoscópico e cortados com navalhas de vidro com espessura de 2 μm em ultramicrotomo (ultra-microtome MT-1, Sorvall, Newtown, Connecticut, U.S.A.). Estes cortes foram depositados em lâminas histológicas e corados com solução de azul de toluidina 0,25%. Através da microscopia de luz, foram delimitadas as regiões de interesse para este estudo. Os blocos foram novamente trimados, deixando em evidência somente a área de interesse, e cortes ultrafinos de 60 nm foram obtidos em ultramicrotomo Super Nova (Reichert-Jung), com navalha de diamante. Os cortes ultrafinos foram depositados em telas de cobre de 300 mesh.

3.6.2- Contrastação

As telas contendo os cortes ultrafinos foram contrastadas com uma solução de acetato de uranila 2% por 20 minutos. Em seguida foram lavadas com água millique (passagem por 8 gotas) e secas em papel de filtro por 1 hora. Após a secagem, as telas foram banhadas com solução de citrato de chumbo por 5 minutos, e novamente lavadas e secadas como já descrito.

3.6.3- Avaliação do Volume relativo (Fração de Volume) Ocupado pelas Gotículas Lipídicas (Weibel, 1979)

Os cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (Leo 906, Zeiss) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, os campos de interesse foram fotografados em aumentos de 1.670 X em áreas abrangendo de duas a três células deciduais contendo

gotículas lipídicas. Os negativos foram ampliados cerca de 5 vezes.

As eletromicrografias foram utilizadas para análise morfométrica com o intuito de obter-se a fração de volume ocupada pelas gotículas lipídicas das células decíduais.

Assim, a fração de volume ocupada pelas gotículas lipídicas das células decíduais nas diferentes micrografias eletrônicas foi avaliada usando-se para este fim um sistema teste contendo 1.517 pontos regularmente espaçados e gravados sobre folha de acetato. Esse sistema teste foi colocado ao acaso sobre as eletromicrografias. Foram anotados o número de pontos que caíam sobre as gotículas lipídicas, sobre o citoplasma e sobre o núcleo das células decíduais.

Através da relação que fornece o volume relativo, pôde-se determinar após contagens em 42 campos microscópicos a fração de volume ocupada pelas gotículas

lipídicas. A relação para o cálculo do volume relativo encontra-se discriminada abaixo:

$$P_{pi} = p/P$$

P_{pi} = fração de volume ou volume relativo.

P = número total de pontos sobre as células decíduais.

p = número de pontos sobre as gotículas lipídicas, ou sobre o citoplasma, ou sobre o núcleo.

3.7 -Processamento para Parafina

O material fixado em solução de Bouin foi desidratado em uma bateria de álcool de 70 a 100%. Logo após, foi embebido em xilol e finalmente em parafina. Seguiu-se então a inclusão em parafina, para a qual os sítios foram adequadamente orientados visando a obtenção de cortes transversais de 6µm. Na microtomia, o referencial foi o plano de corte em que o embrião estava presente. Esses

sítios foram coletados em lâminas histológicas que foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina.

3.7.1- Avaliação da Espessura das Diferentes Camadas Componentes do Sítio de Implantação Embrionária

As espessuras do miométrio e das regiões de estroma não-decidualizado, de células pré-decíduais e de células decíduais maduras foram avaliadas nos cortes histológicos com o auxílio de uma ocular de tambor 10X com filamento deslocável e objetiva de 10X.

Após a medição dessas estruturas, procedeu-se a calibração da ocular com uma lâmina especial, provida de divisões de 0,01 mm (10µm), visando transformar as unidades da ocular em micrômetros.

As medidas foram tomadas sempre da lateral esquerda do corte, tendo como referência o embrião e a região mesometrial. Para individualizar as camadas, foram

tomados como referência os estágios de diferenciação das células do estroma uterino, bem como as diferenças entre os tipos celulares que constituem o órgão.

3.8 - Tratamento Estatístico dos Dados

Os valores obtidos para as frações de volumes ocupadas pelas gotículas lipídicas, bem como os valores obtidos para as espessuras das diferentes camadas dos sítios de implantação embrionária dos 2 grupos em estudo foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA).

4 - RESULTADOS

1.- Resultados Histoquímicos

Os úteros dos animais tratados com indometacina (IM) apresentaram-se pequenos, pouco vascularizados, mais assemelhado-se aos úteros de início de 6º dia de gestação (DDG) do que aos de 7º DDG propriamente dito. Apresentaram o mesmo número de sítios de implantação embrionária, porém estes diminuídos em aproximadamente 18% do seu diâmetro, quando comparados aos controles, conforme mostra a Figura 1.

1.1.-Região de Decídua Madura

Ao redor do embrião, as células do estroma endometrial encontraram-se plenamente decidualizadas, isto é, com volume aumentado e espaço extracelular muito reduzido, ocupado por matriz extra-celular.

Nos controles, esta região mostrou que as células plenamente decidualizadas apresentaram moderada sudanofilia (++) distribuída pelo citoplasma (Fig. 2). Excetuando uma faixa, de cerca de 1/3 da extensão da região de decídua madura,

imediatamente justaposta ao embrião, que mostrou-se fracamente positiva (+).

Diferenças marcantes quanto à sudanofilia, foram observadas entre os animais controles e os animais tratados com IM. Nos animais que receberam IM, a sudanofilia foi bem mais acentuada (++++), (Fig.3) e mais abrangente, ou seja, maior número de células apresentaram sudanofilia em seu citoplasma (Figs 4 e 5).

Quanto à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina (FCC), pôde-se notar maior reatividade nas células decidualizadas abrangendo os 2/3 mais periféricos da região de decídua madura. Tanto nos animais controles como nos animais que receberam indometacina, a reação de FCC mostrou grânulos vermelho-arroxeados, dispersos pelo citoplasma. Alguns ocuparam uma posição mais polar dentro das células, enquanto outros estavam justapostos ao núcleo. Nos animais controles, a reação do FCC foi menos intensa (++) (Fig. 6). Nem todas as células apresentaram grânulos corados com a reação do FCC; algumas células apresentaram maior número de grânulos que outras. Nos

animais tratados com IM a reação para FCC foi mais intensa (++++)(Fig. 7), e também mais generalizada, atingindo maior número de células decíduais (Fig. 8), com maior concentração de grânulos de cor púrpura em seu citoplasma (Fig. 9).

1.2- Região de Células Pré-decíduais

Esta região compreende as células parcialmente decidualizadas, situadas entre a decídua madura e o estroma não decidualizado.

Estas células apresentaram sudanofilia em menor intensidade (+) que a observada na região de decídua madura, tanto nos animais controles como nos tratados (Figs 10 e 11).

As células pré-decíduais, situadas próximas à região de decídua madura, também apresentaram alguns grânulos arroxeados nos sítios de implantação embrionária tratados com IM (++), porém esta reação para fosfolípidos contendo colina foi menos intensa quando comparada com a região de decídua madura (Figs. 12 e 13).

1.3- Região de Estroma não decidualizado (END)

Esta região é composta por células estreladas, tipo fibroblastos. A sudanofilia observada em ambos tratamentos foi fraca (+), a reação para FCC (Figs. 14 e 15) foi fracamente positiva (+) tanto nos animais controles como nos tratados.

Uma melhor comparação entre as intensidades das reações, nas três regiões estudadas, é vista na Tabela I.

Tabela I- Intensidade das reações dos lípides submetidos ao Sudan black e à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina (FCC) em diferentes regiões da decídua no 7º DDG tratados com IM e não tratados (controles).

REGIÕES	REAÇÕES	TRATADOS	CONTROLES
DECÍDUA MADURA	SUDAN BLACK	++++	++
	FCC	++++	++
PRÉ-DECÍDUA	SUDAN BLACK	+	+
	FCC	++	+
END	SUDAN BLACK	+	+
	FCC	+	+

Os resultados indicam intensidades progressivas de reação (+ a ++++).

2- Resultados Quantitativos

2.1- Avaliação Morfométrica das Camadas Constituintes do Sítio de Implantação Embrionária

Através de medições tomadas das diferentes camadas do sítio de implantação embrionária, foi constatada uma redução de 18% do tamanho dos sítios de implantação, provenientes dos animais tratados com indometacina (Fig. 1).

A camada de células decíduais maduras, representada na Fig. 16, apresentou, nos animais tratados com indometacina, tamanho médio de $494,21 \mu\text{m} \pm 91,1$ enquanto que a mesma camada nos animais controles mediu $597,95 \mu\text{m} \pm 59,6$ (Tabela II). Esses dados são significativamente diferentes a nível de 5% pela análise de variância ANOVA.

Sob a mesma análise, constatou-se diferença significativa a nível de 5% entre as camadas de células pré-decíduais (Fig. 16) dos dois grupos estudados, ou seja, nos animais tratados com indometacina a média obtida foi de $211,41 \mu\text{m} \pm 57,9$ e a média

nos animais controles foi de $271,16 \mu\text{m} \pm 60,8$ como mostra a Tabela II.

A região de estroma não decidualizado (Fig. 17) dos dois grupos de animais não mostraram diferenças significativas a nível de 5%, como mostrou a análise ANOVA, ou seja, média de $114,99 \mu\text{m} \pm 28,3$ foi verificada nos animais tratados e a média de $130,13 \mu\text{m} \pm 48,8$ nos animais controles (Tabela II).

Diferenças não significativas foram observadas entre as camadas de miométrio dos dois grupos (Fig. 17), ou seja média de $154,22 \mu\text{m} \pm 57,6$ nos animais tratados e média de $166,31 \mu\text{m} \pm 61,5$ nos animais controles, como mostra a Tabela II.

TABELA II - Demonstrativo de média e desvio padrão obtidos nas camadas dos sítios de implantação dos grupos experimentais: tratado com indometacina e controle

REGIÕES	CONTROLE	TRATADO
DECÍDUA MADURA*	597,95 $\mu\text{m} \pm 59,6$	494,21 $\mu\text{m} \pm 91,1$
PRÉ-DECIDUAL*	271,16 $\mu\text{m} \pm 60,8$	211,41 $\mu\text{m} \pm 57,9$
ESTROMA NÃO DECIDUALIZADO	130,13 $\mu\text{m} \pm 48,8$	114,99 $\mu\text{m} \pm 28,3$
MIOMÉTRIO	166,31 $\mu\text{m} \pm 61,5$	154,22 $\mu\text{m} \pm 57,6$

* dados significativamente diferentes a nível de 5% pela análise de variância ANOVA

2.2- Avaliação do Volume Relativo

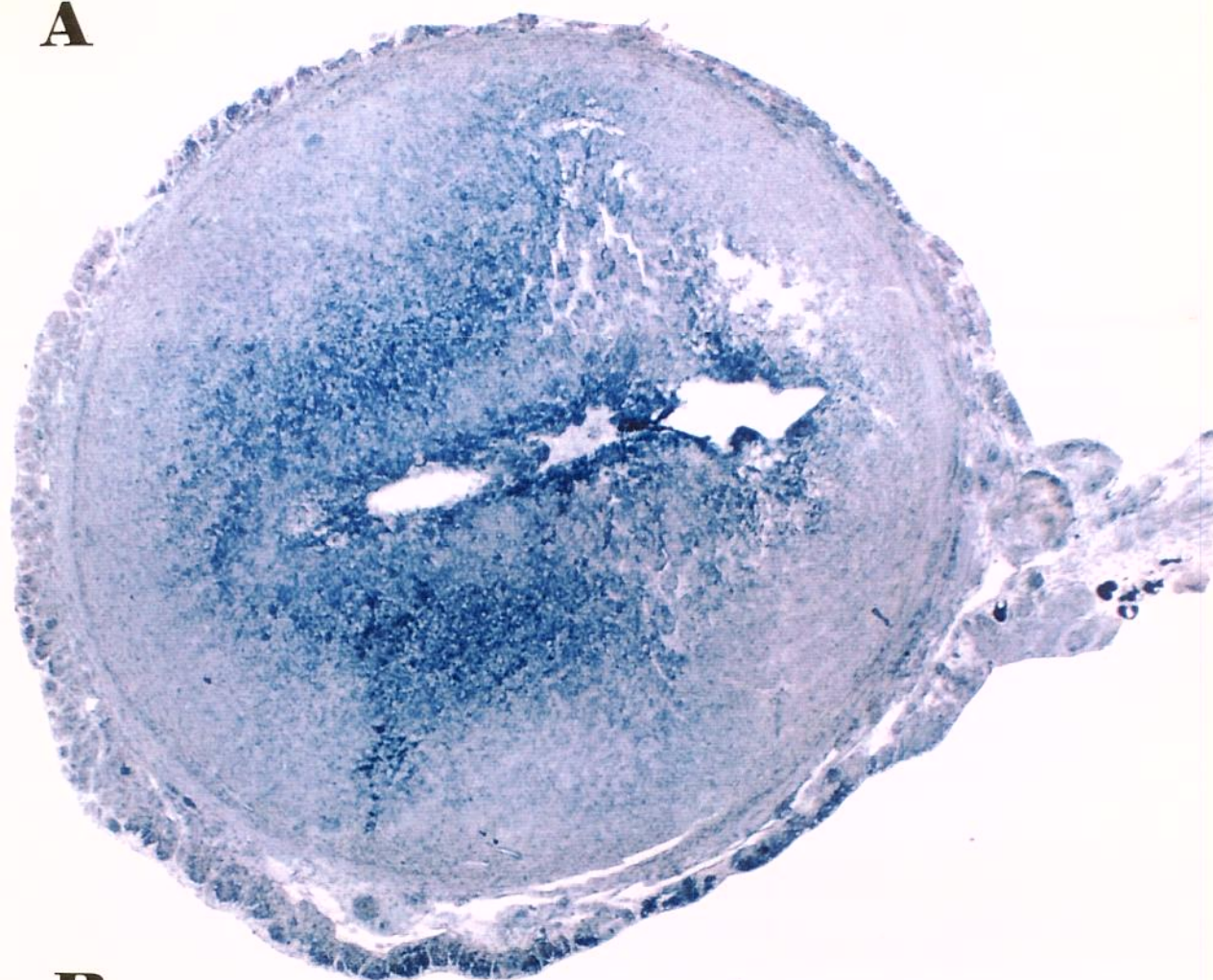
A fração de volume ocupada pelas gotículas lipídicas presentes nas células deciduais dos animais controles é relativamente pequena ($P_{pi} = 0,025$ ou 2,5%) (Figs. 18 e 19). quando comparada com animais tratados com indometacina, pôde-se observar um aumento de cerca de 30% nessa fração de

volume, cujo valor foi $P_{pi} = 0,032$ ou 3,2% (Figs. 20 e 21). Esse aumento é significativo a nível de 5%, análise ANOVA.

5 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 1 - Cortes transversais de sítios de implantação de úteros no 7º DDG. Em **A** controle e em **B** tratado com IM. Notar a diferença de diâmetro entre o controle e o tratado com IM. Sudan-black. 85X.

A



B

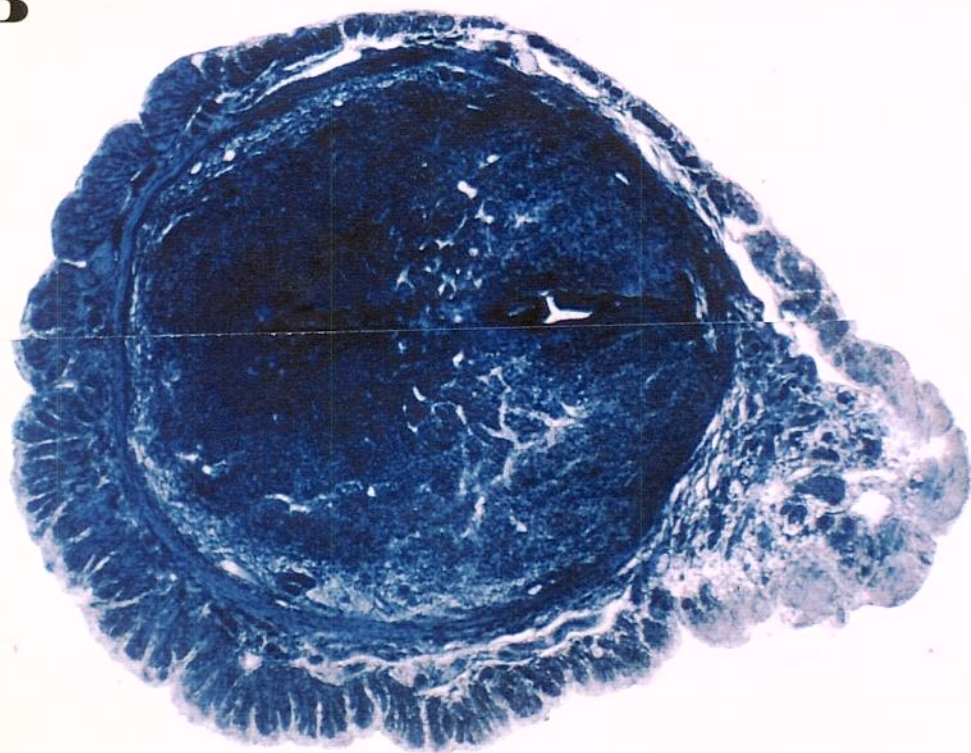


Figura 2 - Corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG (controle), mostrando a sudanofilia da região de decídua madura (DM); Câmara Embrionária (CE). Sudan-black 300X

Figura 3 - Corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG tratado com IM, mostrando sudanofilia da região de decídua madura (DM); Embrião (E). Sudan-black 300X

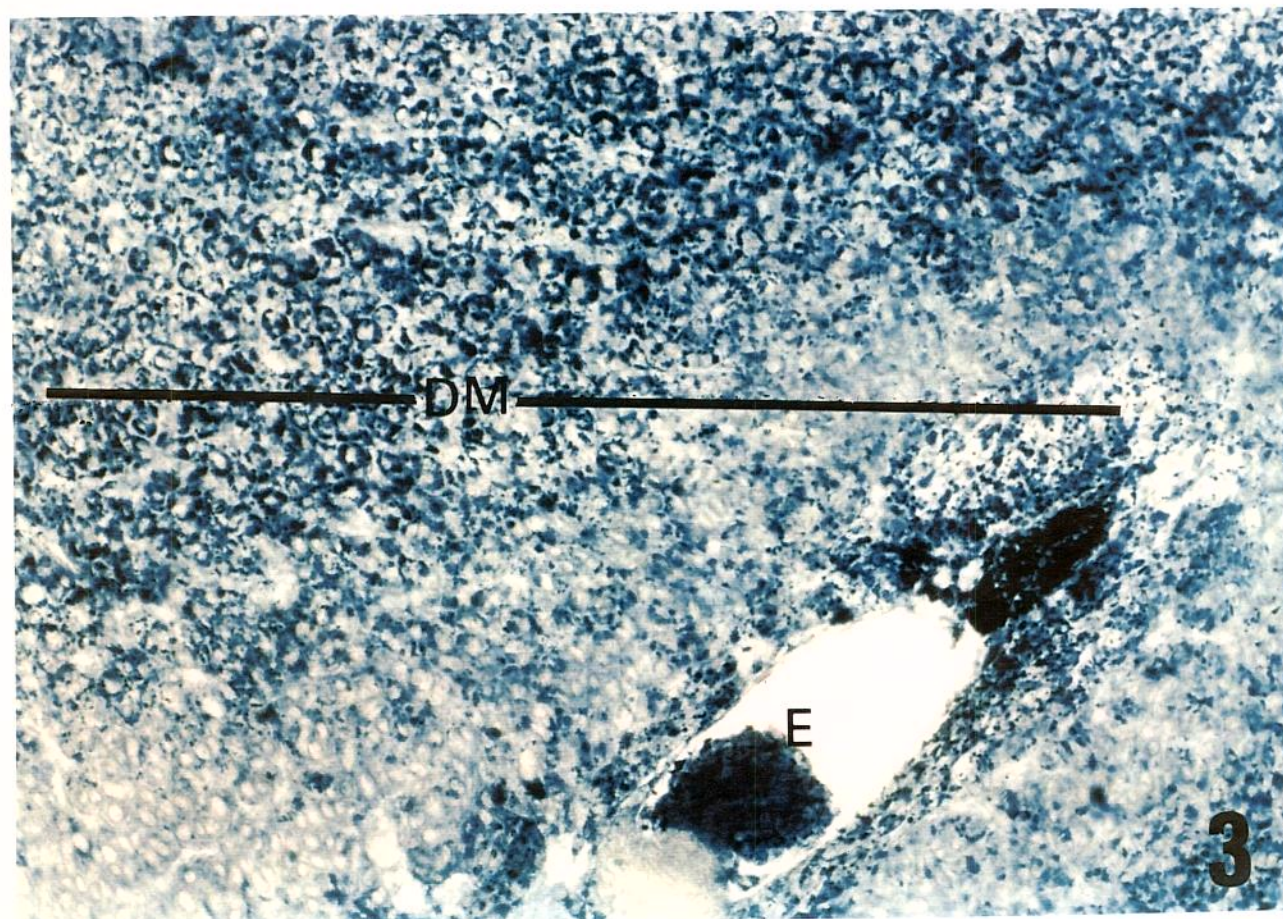
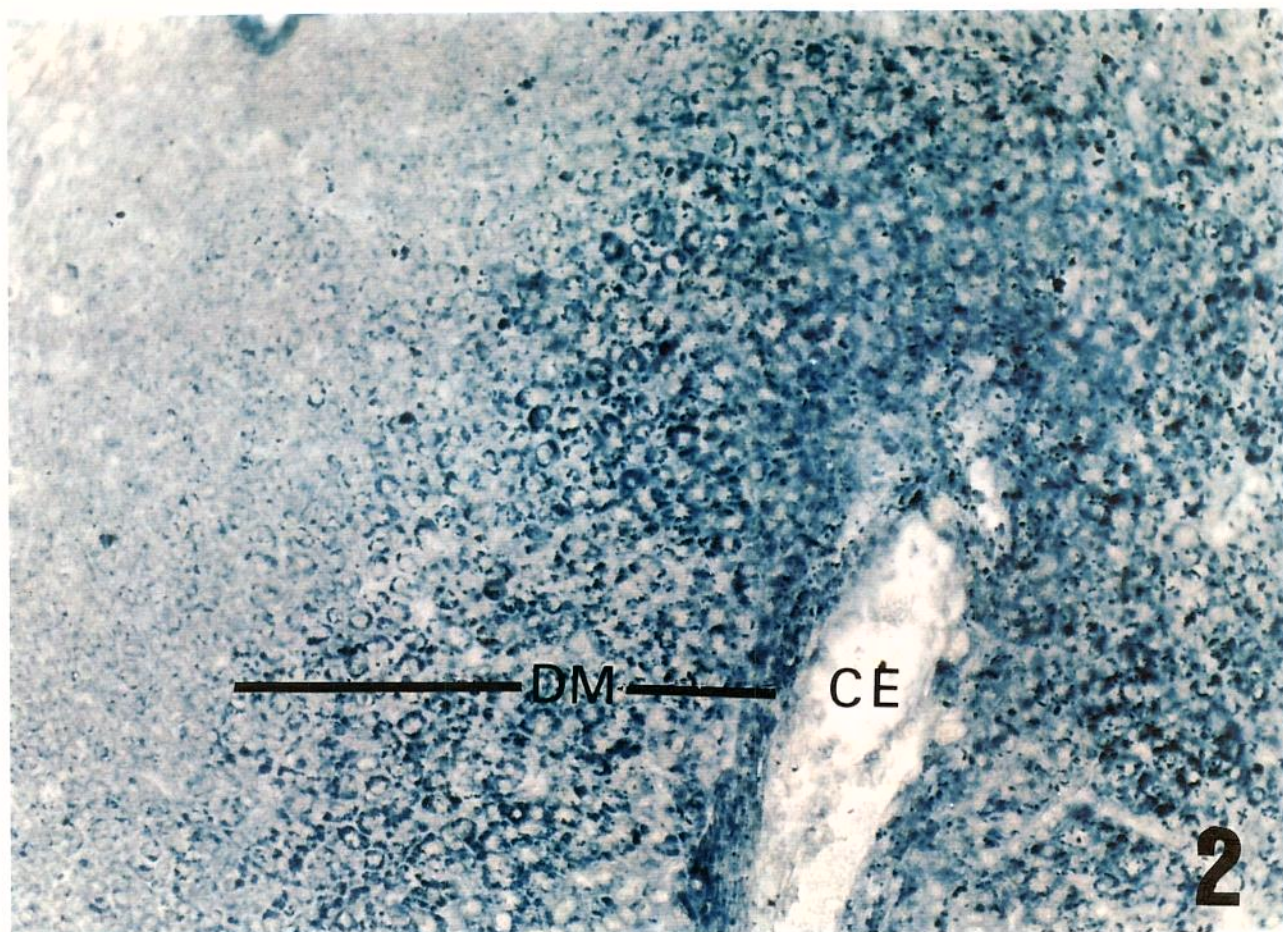


Figura 4 - Detalhe da figura anterior, mostrando grande número de células decíduais maduras com inclusões sudanófilas (setas). Sudan-black. 1.300X.

Figura 5 - Detalhe da figura anterior, mostrando grande número de inclusões sudanófilas (setas) presentes no citoplasma das células decíduais. Sudan-black. 2.600X.

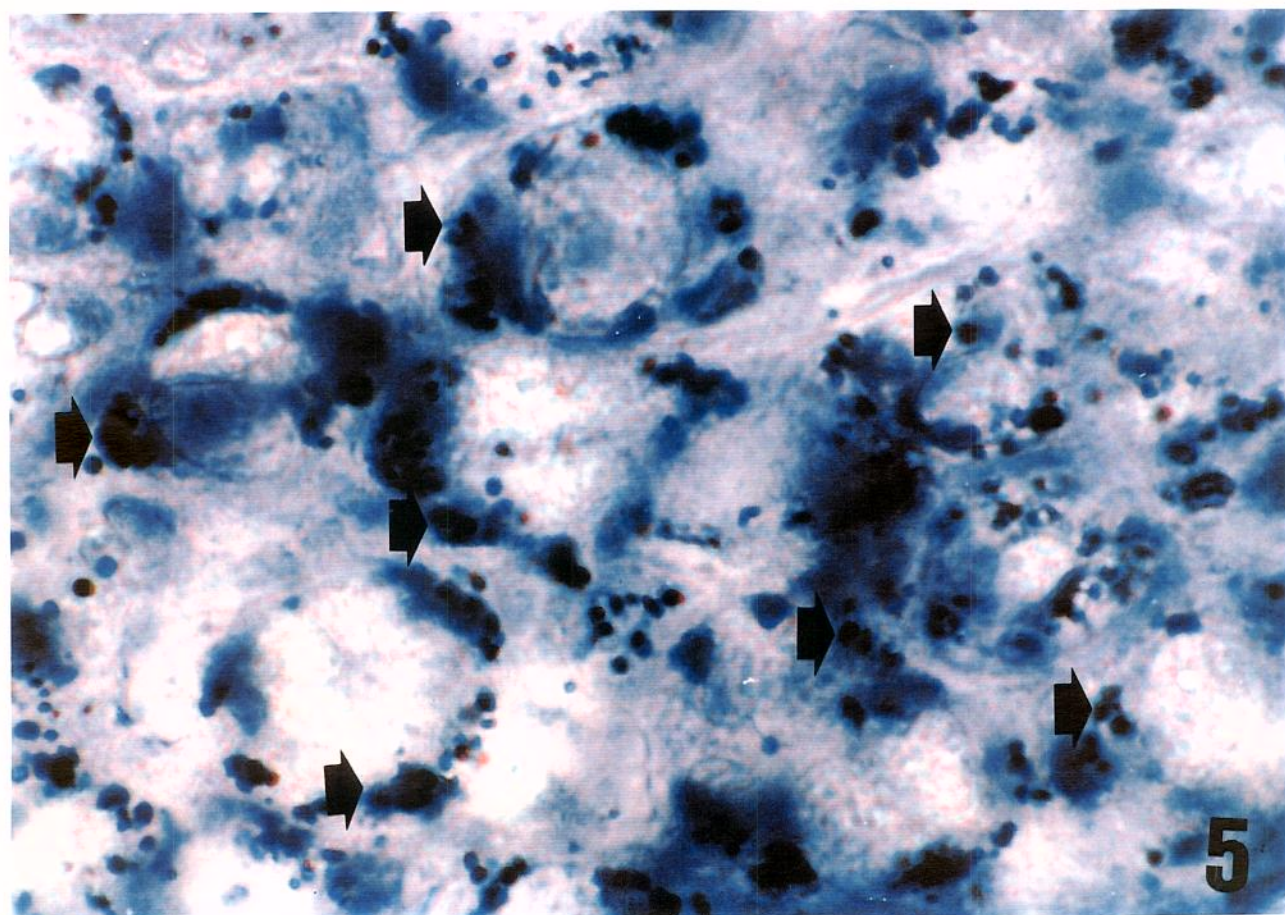
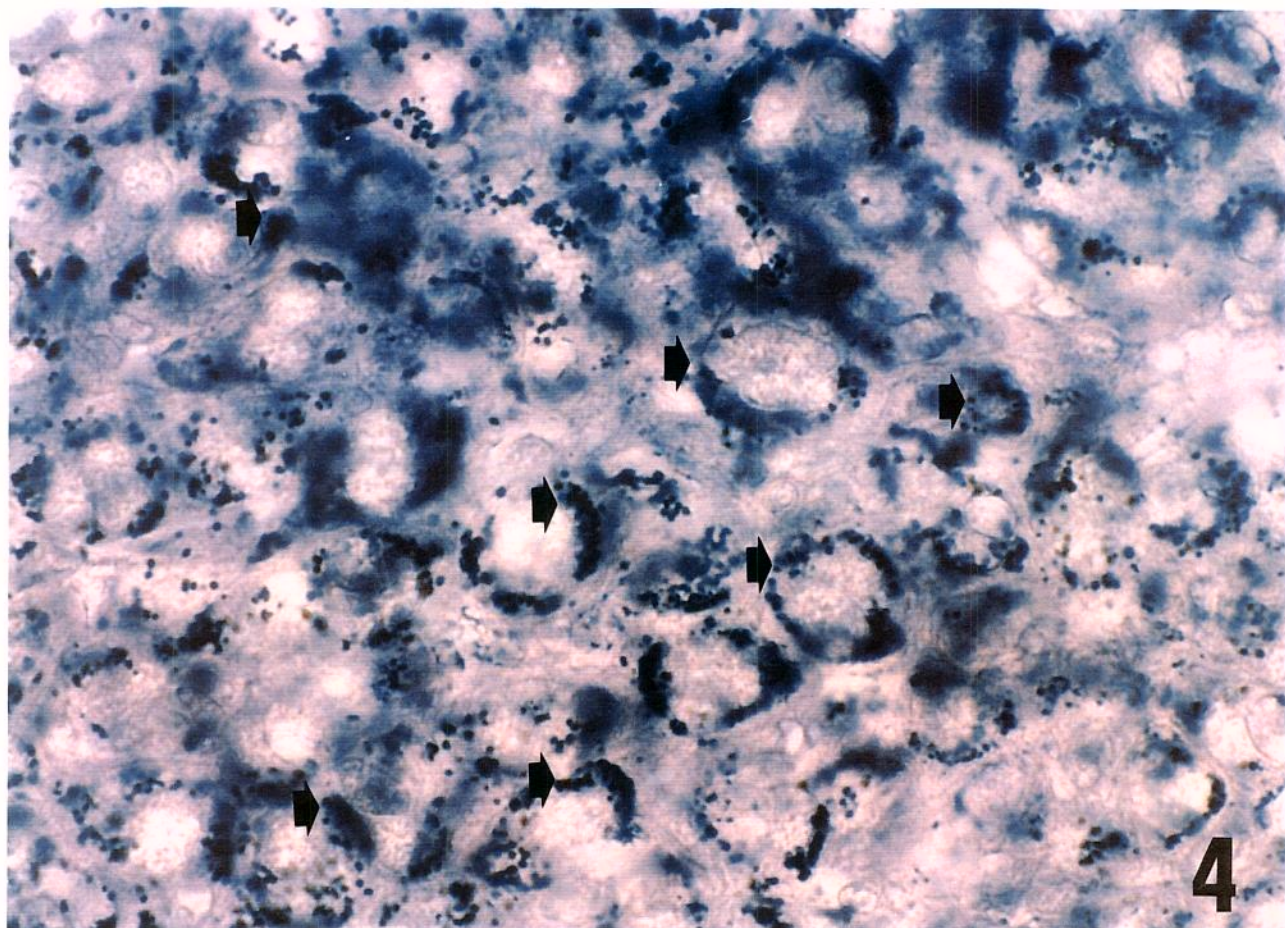


Figura 6 - Corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG (controle), mostrando reação para fosfolípidos contendo colina na região de decídua madura (DM); Câmara Embrionária (CE). 170X

Figura 7 - Corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG tratado com IM, mostrando reação para fosfolípidos contendo colina na região de decídua madura (DM); Embrião (E). 170X



Figura 8 - Detalhe da figura anterior, mostrando grande número de células decíduais maduras coradas para FCC (setas). 670X.

Figura 9 - Detalhe da figura anterior, evidenciando grande concentração de grânulos (setas) de FCC no citoplasma das células decíduais maduras. Núcleo em imagem negativa (*). 1.300X.

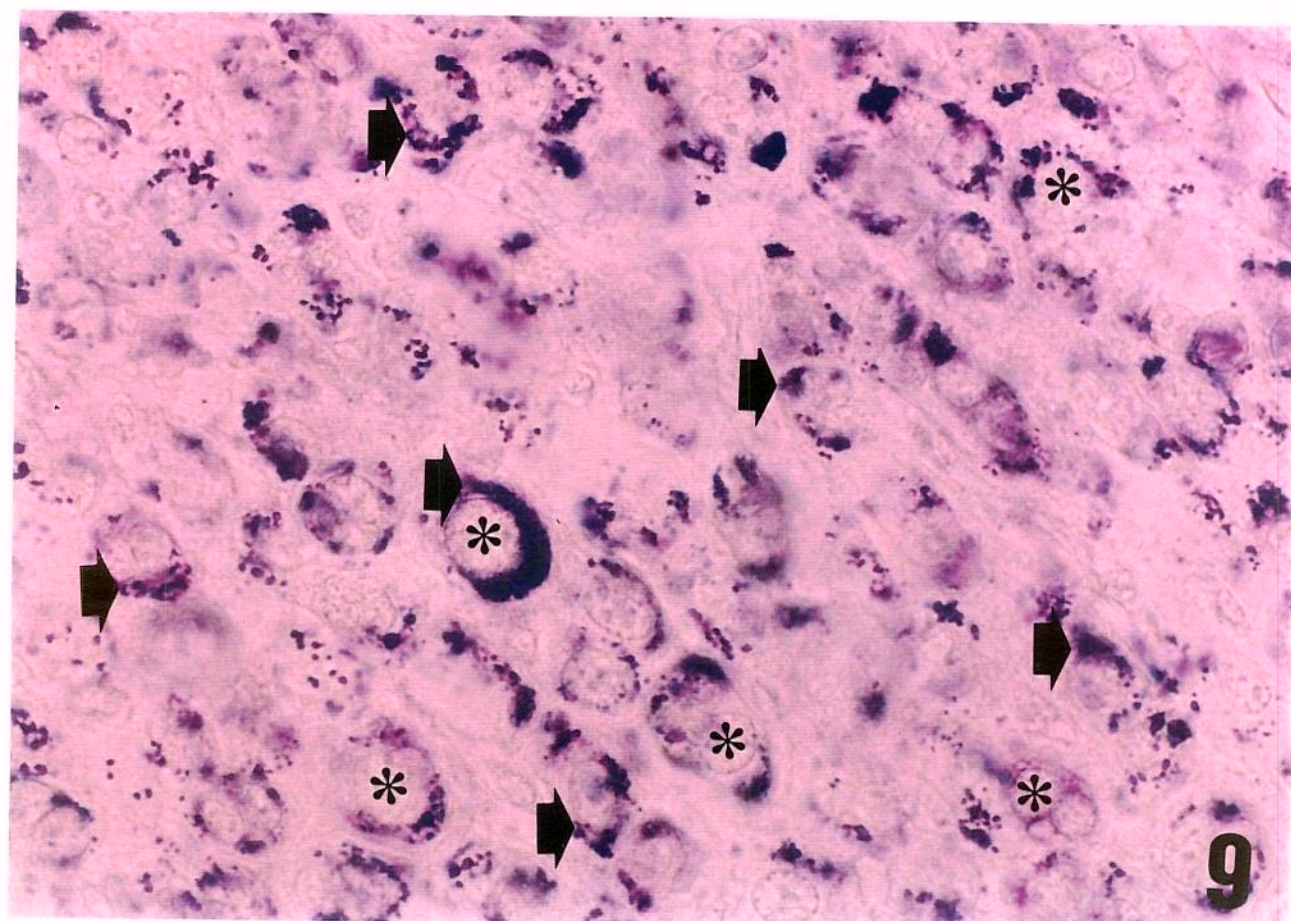
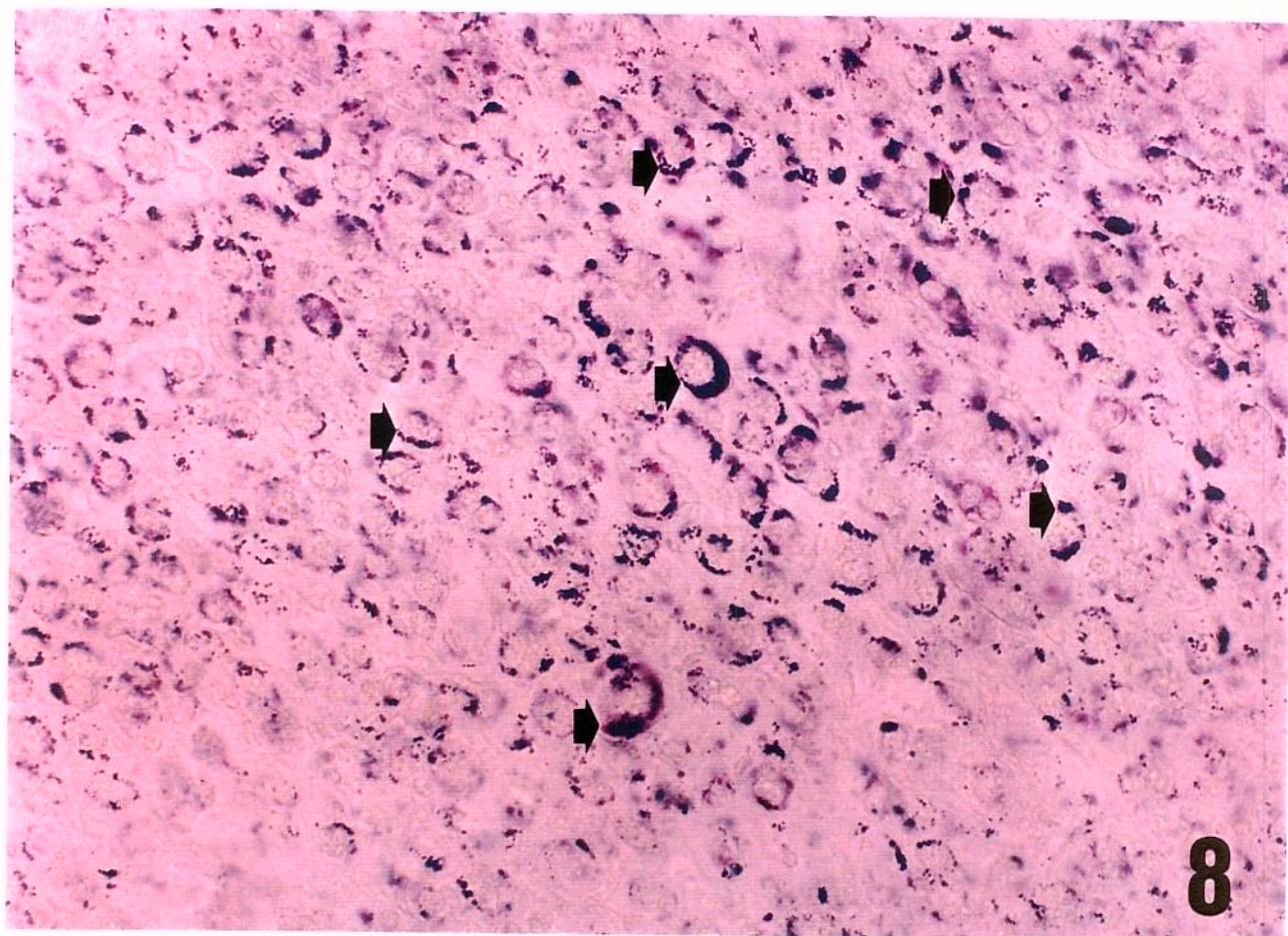


Figura 10 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal controle, submetido à reação de Sudan Black, região pré-decidual (PD). 170X.

Figura 11 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG tratado com IM, submetido à reação de Sudan Black na região pré-decidual (PD). 170X.

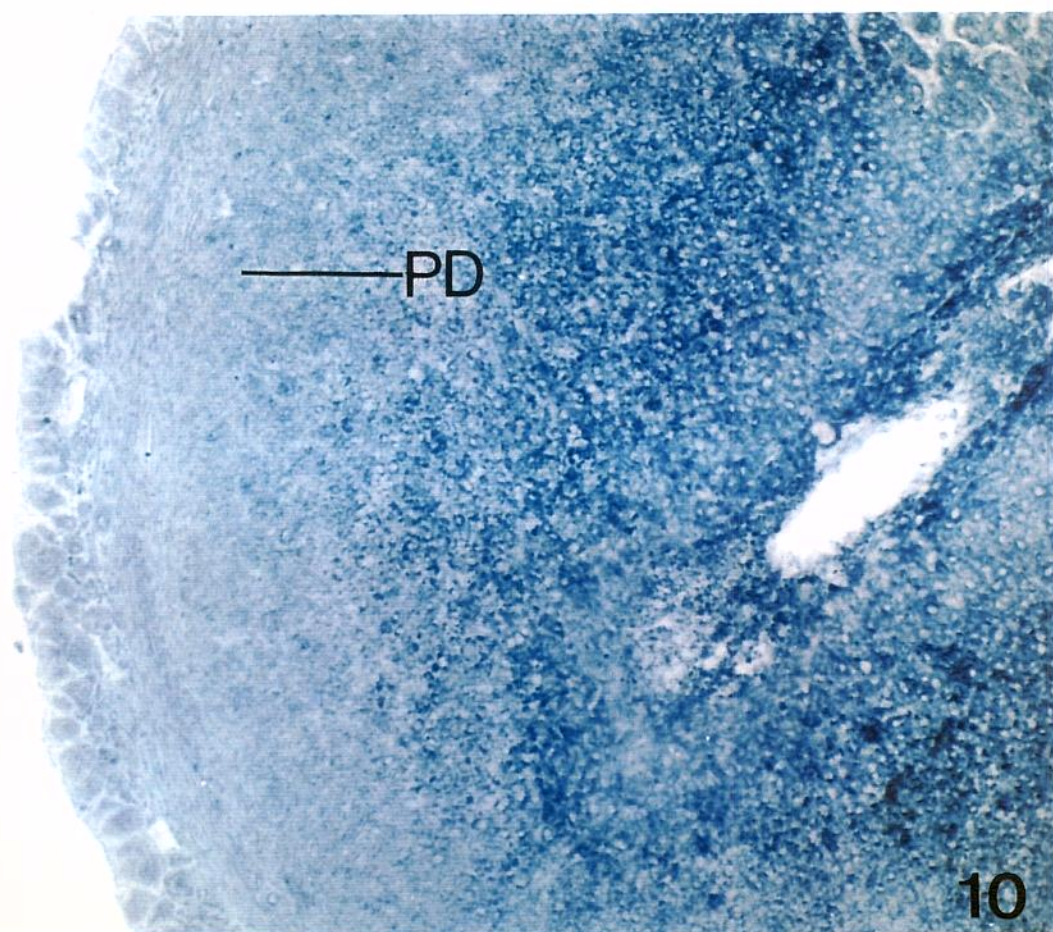


Figura 12 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal controle, submetido à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina . Região pré-decidual (PD). 170X.

Figura 13 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal tratado com indometacina, submetido à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina . Região pré-decidual (PD). 170X.

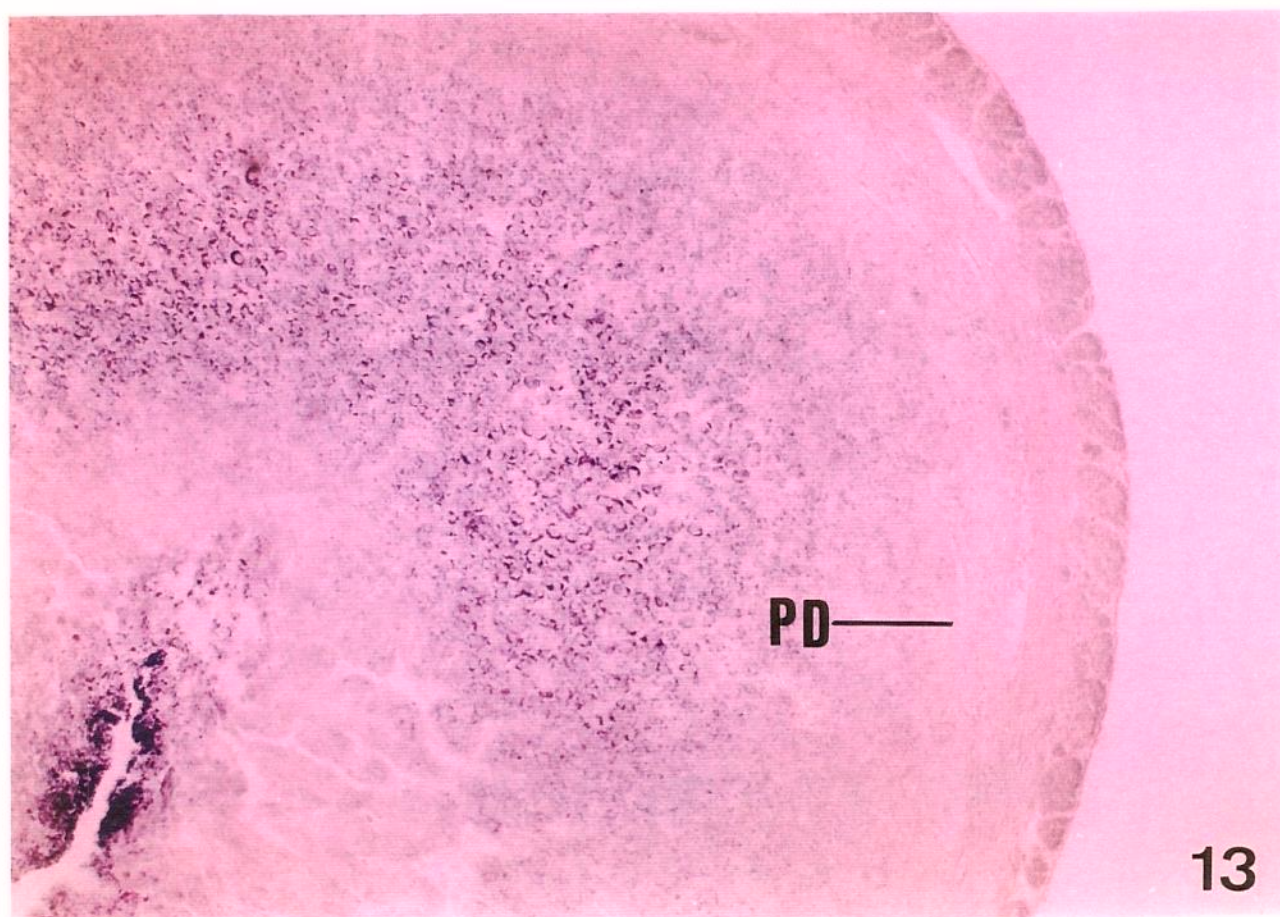
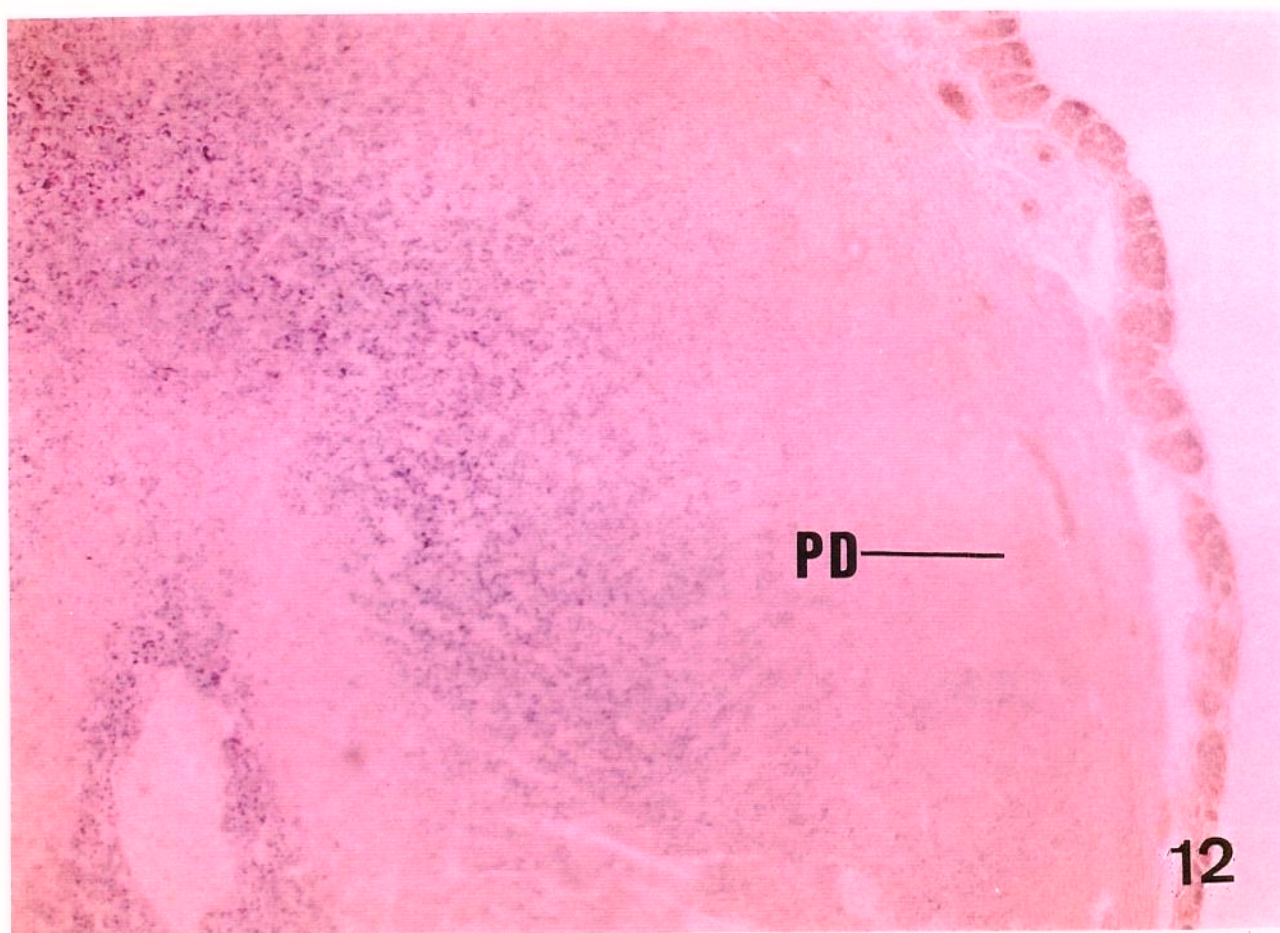


Figura 14 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal controle, submetido à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina. Região de estroma não decidualizado (END). 340X.

Figura 15 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal tratado com indometacina, submetido à reação para detecção de fosfolípidos contendo colina. Região de estroma não decidualizado (END). 340X.

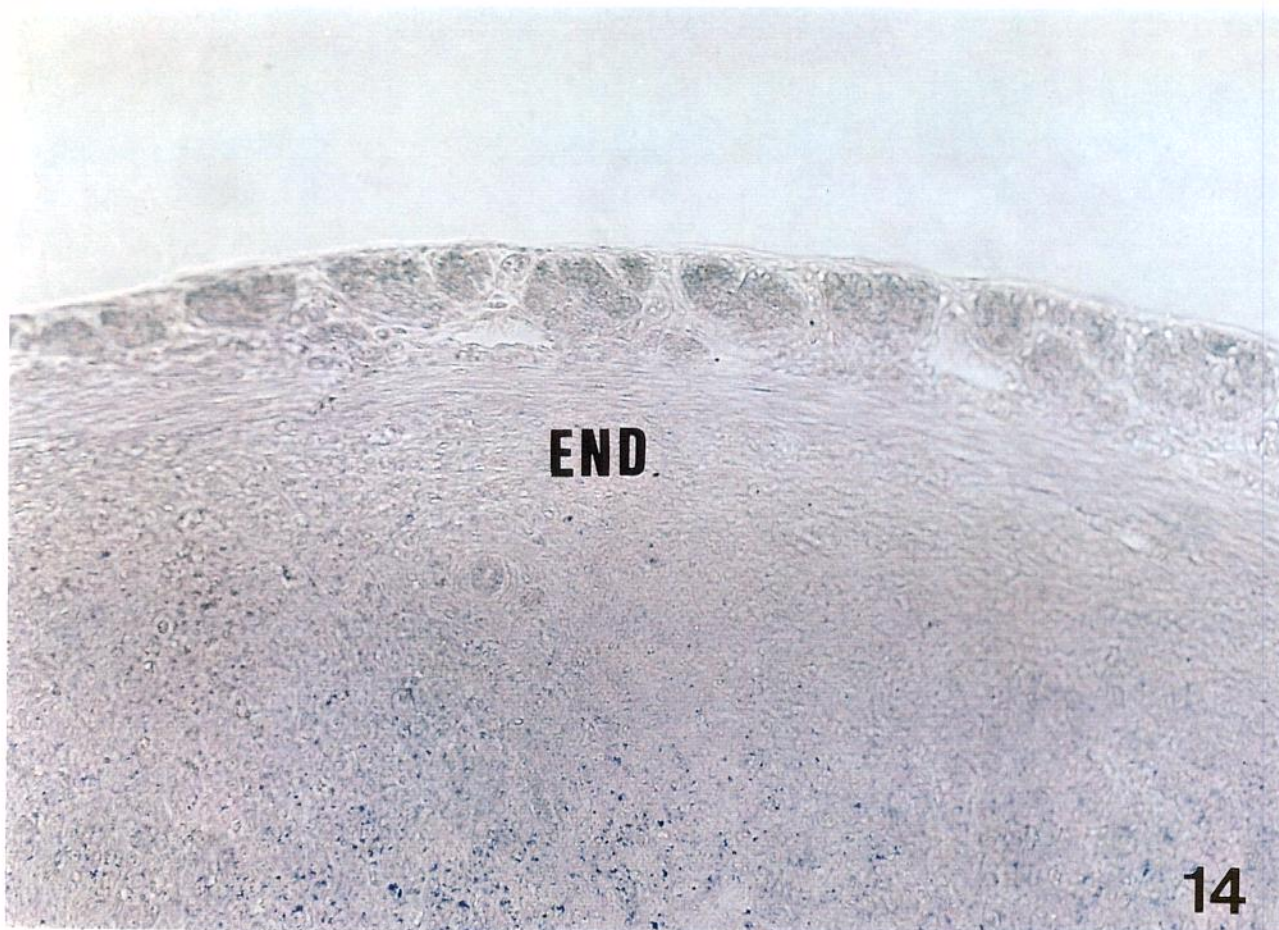


Figura 16- Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal controle, mostrando as camadas de células decíduais maduras (DM) e pré-decíduais (PD) utilizadas na avaliação morfométrica . HE. 340X.

Figura 17 - Fotomicrografia de corte transversal de sítio de implantação de útero no 7º DDG de animal controle, mostrando as camadas de estroma não decidualizado (END) e miométrio (M), utilizadas na avaliação morfométrica . HE. 340X.

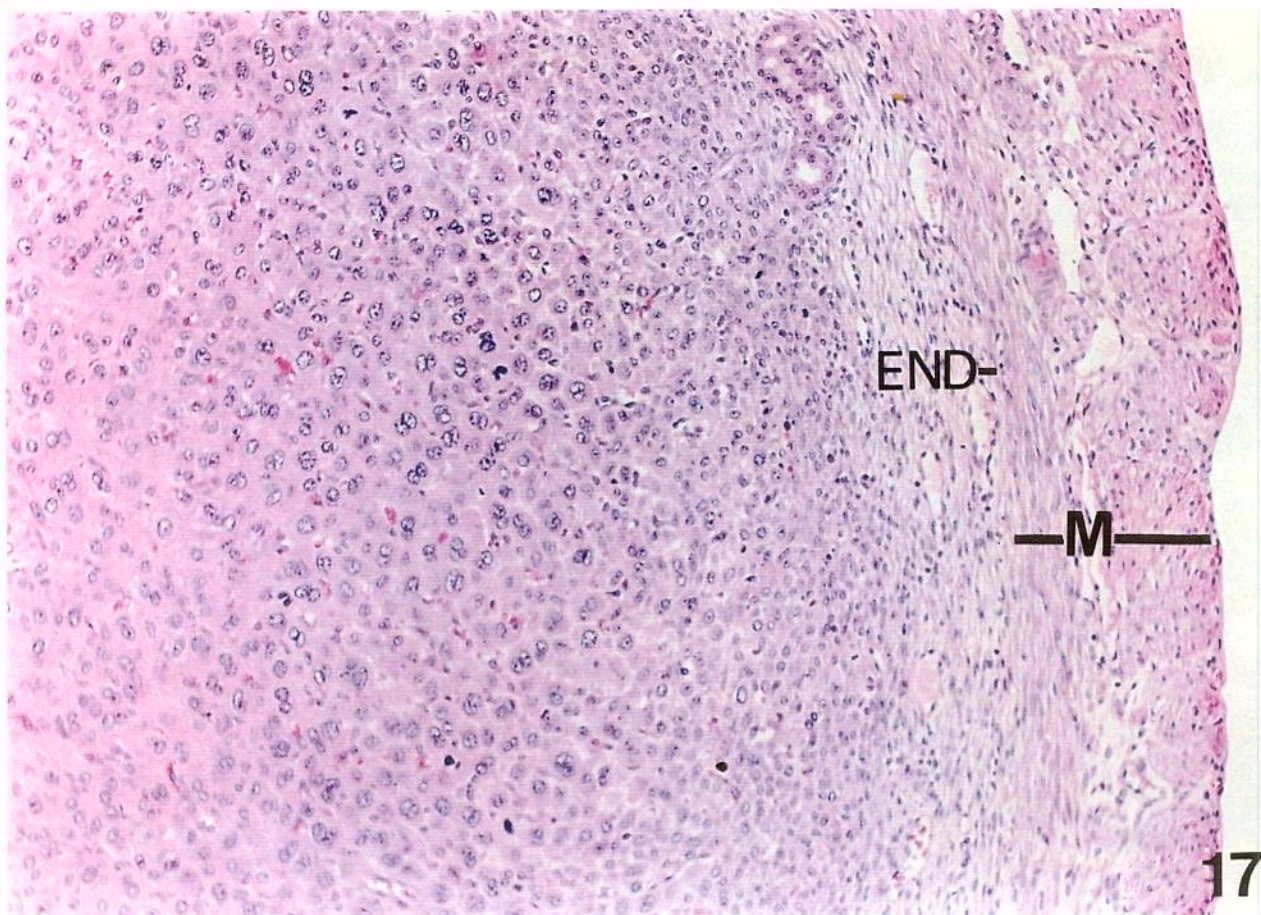
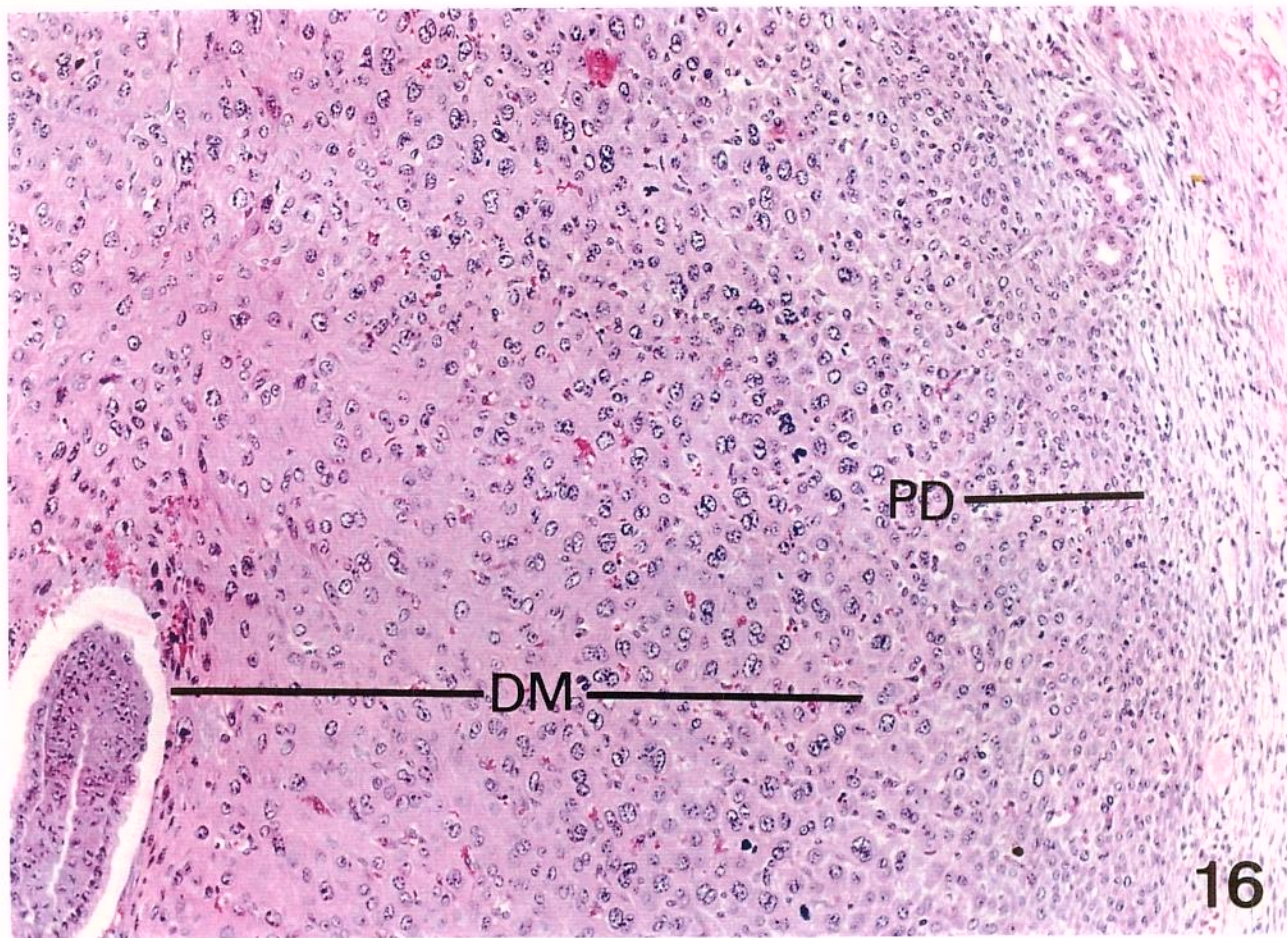


Figura 18 - Electromicrografia de células decíduais no 7º DDG de animal controle, mostrando algumas gotículas de lipídeo (setas), núcleo (N). 28.000X

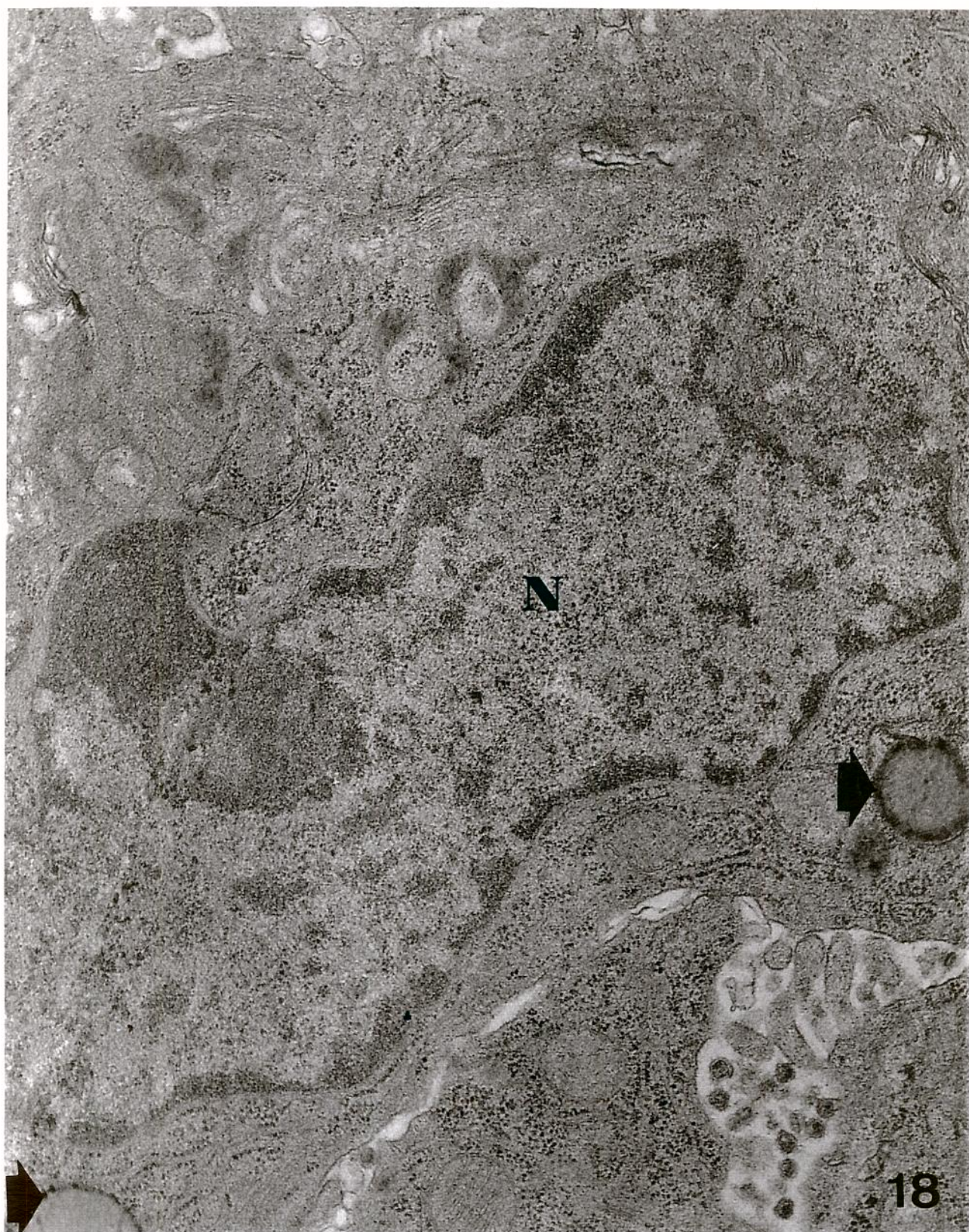


Figura 19 - Electromicrografia de células decíduais no 7º DDG de animal controle, mostrando algumas gotículas de lipídeo (setas), junções (cabeça de setas). 24.300X.

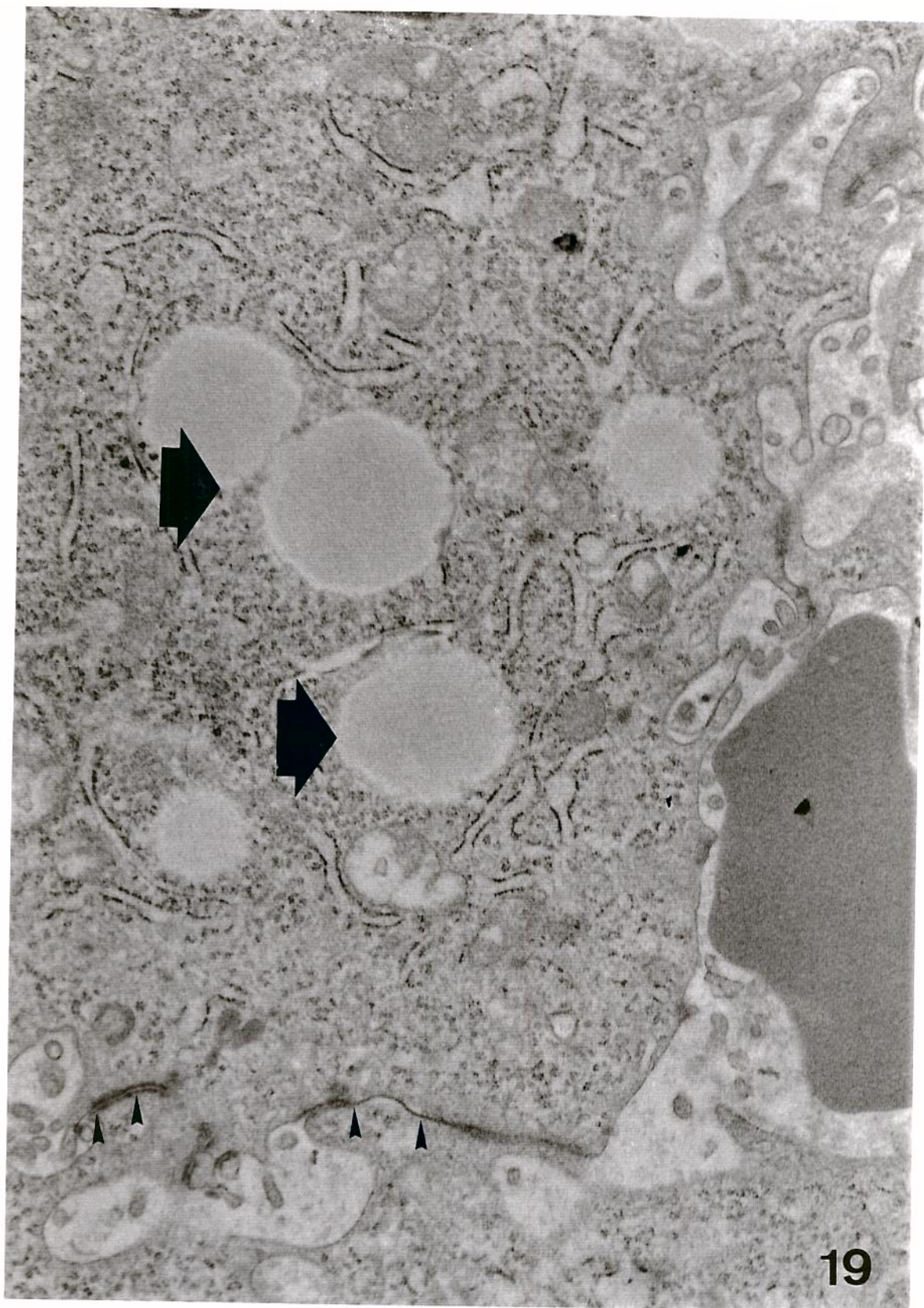


Figura 20 - Electromicrografia de células decíduais no 7º DDG de animal tratado, mostrando várias gotículas de lipídeo (setas), núcleo (N). 34.000X.

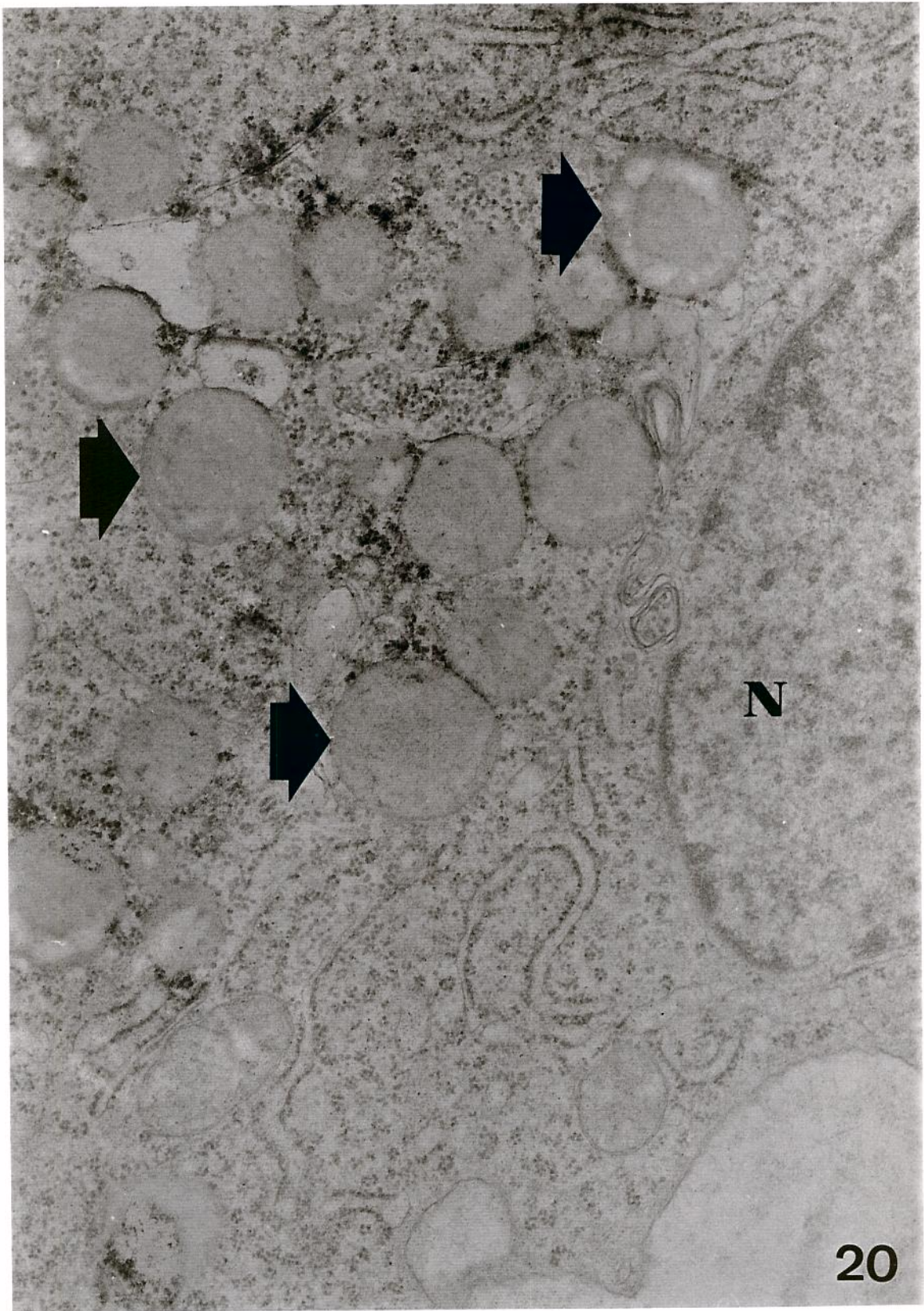
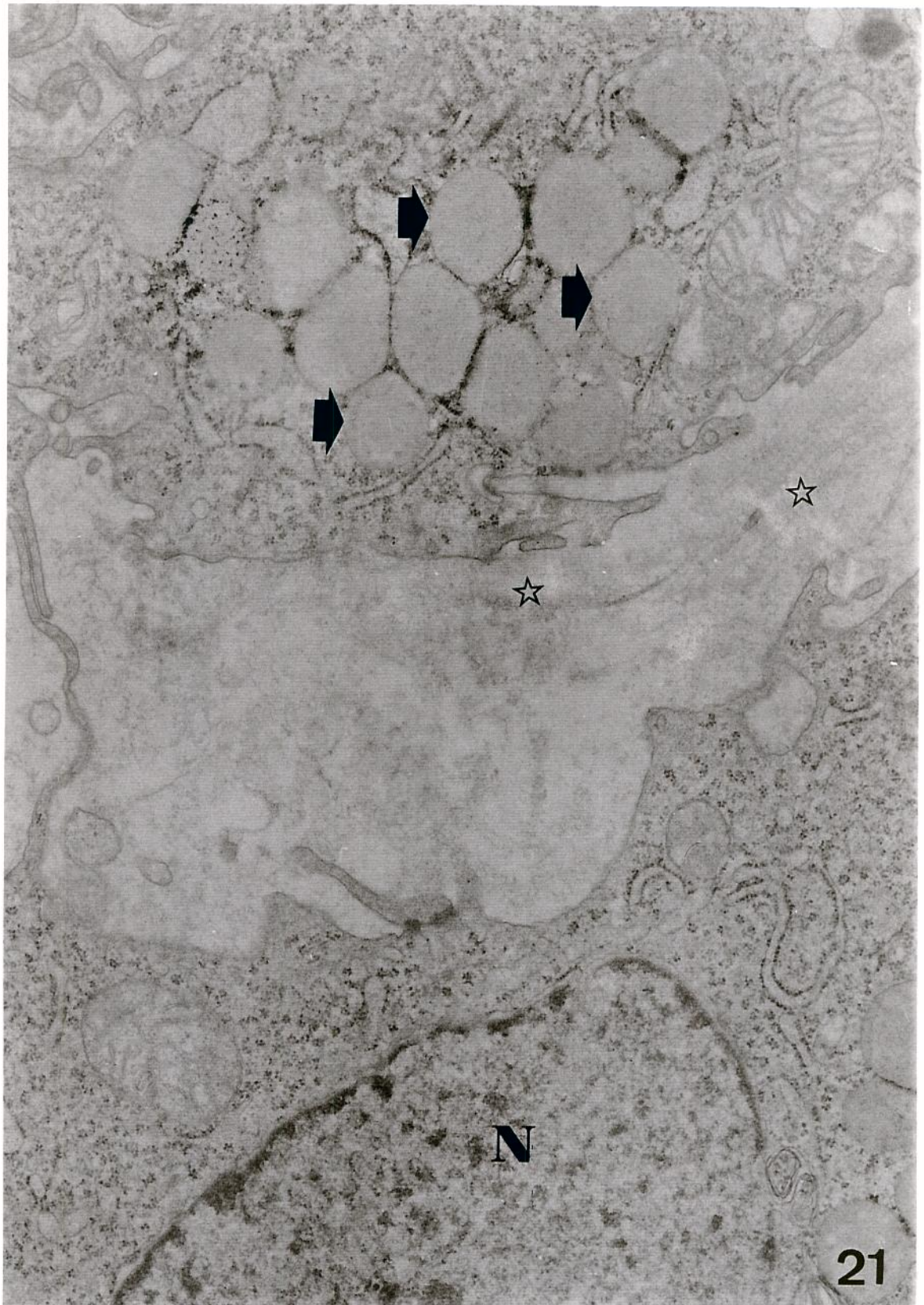


Figura 21 - Electromicrografia de células decíduais no 7º DDG de animal tratado, mostrando várias gotículas lipídicas (setas), núcleo (N). Observar no espaço extracelular fibrilas de colágeno em corte longitudinal (λ). 26.500X.



6 - DISCUSSÃO

Neste trabalho propusemo-nos a estudar os efeitos da administração de indometacina sobre o conteúdo lipídico dos sítios de implantação embrionária. É bem conhecido que as prostaglandinas agem sobre o local de implantação embrionária aumentando a permeabilidade vascular e estimulando a formação de edema (Psychoyos, 1961). A administração de indometacina, um potente antiinflamatório não esteróide, inibe a biossíntese de prostaglandina, através da inibição da enzima prostaglandina sintase. Esta ação tem consequência na implantação, ou na decidualização do endométrio retardando este processo ou a implantação do embrião em ratos, camundongos, hamsters e coelhos (Hamilton & Kennedy, 1983)

Nossos resultados mostraram que os sítios de implantação tratados com indometacina são cerca de 18% menores do que os controles. As camadas do estroma decidualizado que sofreram essa ação foram a camada de células deciduais maduras e a de células pré-deciduais, ou seja a porção do estroma uterino envolvida na formação da decídua. Estes

resultados estão de acordo com os obtidos por Kennedy, (1985), que demonstrou a diminuição do peso dos úteros de ratos tratados com indometacina.

As prostaglandinas são uma família de lipídios bioativos derivados de fosfolípides. As três maiores séries de prostaglandinas são as A, E e F que diferem com base nos grupos funcionais em torno do anel ciclopentano: a do tipo E é uma hidroxicetona; a da série F possui o grupo 1,3 diol e as da série A são α - β cetonas insaturadas. Os numerais subscritos (1, 2 ou 3) referem-se ao número de duplas ligações ao longo da cadeia. Os símbolos α e β referem-se à configuração do grupo C-9 OH, sendo que α projeta-o abaixo do plano do anel (Devlin, 1994).

Alberto-Rincon et al. (1994), demonstraram a presença de fosfolípides contendo colina no estroma decidualizado de camundongos através de técnicas histoquímicas. Esses autores sugeriram que os grânulos arroxeados encontrados no citoplasma das células deciduais poderiam estar relacionados com a

biossíntese de prostaglandinas pela decídua (Kinohita et al., 1977; Okasaki et al., 1981^b, Campbell, 1990).

Nossos resultados histoquímicos mostraram que a indometacina atua sobre os fosfolípides contendo colina, presentes nas células deciduais, ou seja, é observado nos preparados um acúmulo maior de grânulos arroxeados no citoplasma de células deciduais tratadas com indometacina do que nos animais controles, onde a reação para FCC foi menos intensa. Resultados semelhantes foram obtidos quando a técnica de Sudan Black (lípidos totais) foi empregada. Esses resultados são confirmados pelos nossos achados na microscopia eletrônica, onde há maior quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma de células deciduais submetidas a ação de IM do que em células não tratadas. Este fato pode estar relacionado com o bloqueio da via enzimática para a produção de prostaglandina, uma vez que os lípidos não estariam sendo mobilizados para a formação das PGs.

É bem conhecido o papel estrutural dos fosfolípidos nos sistemas de biomembranas, porém, estudos comprovam que

há presença de fosfolípidos em corpos lipídicos citoplasmáticos em tipos celulares, tais como macrófagos alveolares e mastócitos (Dvorak et al., 1983).

Os fosfolípidos encontrados neste estudo, podem participar da via metabólica para a biossíntese de prostaglandinas, uma vez que, quando submetidos à ação da IM, permanecem estocados no citoplasma das células decíduais.

Flint et al. (1986) especularam que, para que a síntese de prostaglandinas no endométrio de ovinos seja efetiva, lípidos estocados deveriam ser utilizados, de modo a não comprometer a integridade das membranas, uma vez que a quantidade de prostaglandina produzida poderia afetar o “turnover” das membranas.

O sistema enzimático responsável pela biossíntese da prostaglandina é o prostaglandina-sintase. Este complexo cataliza a ciclicização oxidativa de ácidos graxos polinsaturados e, pela ação das fosfolipases A_2 , os fosfolípidos são clivados dando origem ao

ácido araquidônico, o qual é utilizado como precursor de vários eicosanóides, entre eles as prostaglandinas (Irvine, 1982).

Um dos componentes do complexo enzimático é a cicloxigenase, que existe em duas isoformas a cicloxigenase-1 (COX-1), constitutiva, e a cicloxigenase-2 (COX-2), esta última induzida por vários estímulos (Dewitt & Smith, 1995; Yang et al., 1997), como pela citocina interleucina-1 (IL-1) beta (Cole et al., 1995). Estudos recentes mostram que a IL-1 beta faz aumentar os níveis de RNAm para COX-2 bem como da própria proteína na decídua, implicando em uma produção maior de PGE₂ (Mitchell et al., 1995; Kennard et al., 1995; Trautman et al., 1996). A cicloxigenase, referida também como prostaglandina sintase (Fuentes, 1996; Jones et al., 1997), promove a ciclização dos carbonos 9 e 12 do ácido araquidônico para formar 9,11-endoperóxido 15-hidroperóxido cíclico, a PGG₂. Esta é convertida a PGH₂ por uma redução glutathiona peroxidase (GSH)-dependente (PG-hidroperoxidase) que cataliza a reação (Devlin, 1994).

Embora outros vasoativos também tenham papel importante na decidualização (Cejic, 1991), estes, provavelmente, não sofrem inibição pela indometacina, como por exemplo, os metabólitos da via lipoxigenase (Gemsa et al., 1982), já que alguns estudos indicam que a indometacina age inibindo a ciclooxigenase (Ichihara et al., 1992); Níveis aumentados de COX-1 foram detectados no período de pré-implantação, demonstrando a importância desta enzima na síntese de prostaglandinas para a decidualização do endométrio (Chakraborty et al., 1996).

Outros autores também apontam intrínseca relação entre as prostaglandinas e o processo de implantação embrionária (Biggers et al., 1978; Gupta et al., 1989), referindo-se ao aumento da permeabilidade vascular no local de nidificação (Kennedy, 1977, 1983, 1985, 1986, 1990; Psychoyos, 1973), o que possibilita as diferenciações celulares do estroma uterino, bem como a nutrição do blastocisto em processo de implantação.

Muitos autores relacionam fortemente a PGE_2 com o processo reprodutivo tanto para a manutenção da gestação como

para o início do trabalho de parto (Romero et al., 1989; Ishihara et al., 1992). Como já foi mencionado, existe uma correlação intrínseca entre biossíntese de PGs, principalmente a E_2 , e processos inflamatórios: quando lesadas, muitas células podem liberar PGE_2 , produzindo as ações proinflamatórias. Além destas, as PGs E_2 e $F_{2\alpha}$, entre outros reguladores de multiplicação celular, agem simultaneamente com fatores de crescimento e diferenciação, sendo então importantes para a homeostase do tecido (Dewitt & Smith, 1995; Yang et al., 1997). Sob este aspecto, outra propriedade da PGE_2 , compatível com o fenômeno reprodutivo, é sua ação inibitória sobre a atividade de linfócitos maternos com função potencial “killer” na decídua do primeiro trimestre de gestação humana, por bloquear a geração de receptores para interleucina-2 e de interleucina-2 (Parhar et al., 1989; Lala et al., 1988), além de ter efeito imunossupressor (reduz a gênese de células T) (Bogliolo, 1994). Macrófagos maternos nas proximidades do conceito poderiam deflagrar sua rejeição. Além de, quando estimulados, produzirem substâncias de

ação antiinflamatória, como inibidores de fosfolipases (macrocortina, lipomodulina e renocortina), interferindo na liberação de produtos do ácido araquidônico (PG, Leucotrienos). Kniss et al. (1997), observaram que culturas de células epiteliais de endométrio humano incubadas com citocinas como a interleucina-1-beta ou interleucina-1-alfa, e o fator de necrose tumoral-alfa tiveram a produção de prostaglandina E_2 e $F_{2\alpha}$ estimuladas, por estimulação da cicloxigenase. Confirmando estas inferências, Arslan & Zingg (1996), observaram a expressão do gene da COX-2 induzido provavelmente por citocinas na decídua de útero gravídico de ratos.

Sem dúvida, as prostaglandinas desempenham um papel fundamental na manutenção da gestação, seja mediando as transformações do estroma uterino para o estabelecimento do conceito, seja proporcionando um afluxo sanguíneo adequado para nutrição deste conceito através do seu papel angiogênico, seja, principalmente, interagindo com outros agentes homeostáticos de forma que, mesmo diminuindo a expressão de

defesa materna contra um “corpo estranho”, não acarrete prejuízo para nenhuma das partes. Sob este aspecto, sabe-se que outros eicosanóides encontram-se em níveis mais elevados, dependendo do período gestacional na decídua, como é o caso 12-Hidroxieicosatetraenóico (Schafer et al., 1996) que, embora tenha o mesmo precursor que as prostaglandinas, o ácido araquidônico, não teve sua síntese inibida pela indometacina. Talvez por isto mesmo pudemos trabalhar com o modelo decidual, já que outros agentes, que não as prostaglandinas, também desempenham papel importante na decidualização.

7 - CONCLUSÕES

No presente trabalho ficou estabelecido que existe uma estreita correlação entre o conteúdo lipídico, principalmente de fosfolípidos contendo colina, e a biossíntese de prostaglandinas, substância fundamental para a decidualização do endométrio de camundongos. Esta conclusão principal foi baseada nas seguintes observações:

- A aplicação de indometacina, potente inibidor da prostaglandina-sintase, provocou um aumento significativo no conteúdo lipídico nas células envolvidas com a decidualização.
- Não houve mudanças significativas no padrão lipídico da região de estroma não decidualizado e nem do miométrio.

Foi, também, possível verificar que a inibição da síntese de prostaglandina pela indometacina atua no desenvolvimento normal do estroma decidualizado, no que diz respeito ao tamanho das camadas de células deciduais maduras e de células pré-deciduais.

In the aim to analyze the commitment of lipid droplets and their phospholipids contents in the decidual cells as prostaglandin precursors, it was inoculated intraperitoneally, 40 μ L of 25mg indomethacin, a powerful inhibitor of prostaglandin-synthase, solubilized in sesame oil, in the female mice on the fifth days of pregnancy. Controls animals received the same volume of sesame oil. All animals were sacrificed on the 7^o dop. One group of embryo implantation sites was collected and fixed in 3% HgCl₂-formalin solution. Frozen sections (14 μ m thick) were processed for phospholipids containing choline and Sudan Black histochemistry. Another group of Indomethacin treated and untreated animals were fixed with glutaraldehyde under microwave treatment, postfixed in OsO₄ (1%) and processed for usual epoxy resin embedding.

The morphometric analysis showed the volume of Indomethacin treated uterus smaller than untreated one. At microscopic level the decidual reaction was less prominent in the endometrium of treated animal. The phospholipid-containing-choline and Sudan Black histochemistry showed strong reaction in fully differentiated decidual

cells of and less intense in the predecidual zone. When compared the intensity between untreated and treated animals, the later showed strongest reactions. The ultrastructural analyses showed the higher amount of lipid droplets inside decidual cells of Indomethacin treated than untreated animals.

These findings suggest the effective action of Indomethacin on decidual reaction and affected the lipid metabolism. The high storage rates of lipids in the decidual cells and predecidual cells strongly suggests that the phospholipid contents should be the precursor of PGs. Furthermore, the inhibition of PG biosynthesis affects the progression of cells already committed to decidualization.

9 - BIBLIOGRAFIA

Abrahamsohn, P. A. Morphology of decidua, In: *Blastocyst Implantation*, Ed. K. Yoshinaga, Boston, Adams Publ. Group. p:127-133; 1989.

Abrahamsohn, P. A. & Zorn, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.*, 266:603-628, 1993.

Acker, G.; Braquet, P.; Mencia-Hurta, J. M. Role of platelet-activating factor (PAF) in the initiation of the decidual reaction in the rat. *J. Reprod. Fertil.*, 85: 623-630, 1989.

Alberto-Rincon, M. C.; Zorn, T. M. T.; Abrahamsohn, P. A. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Am. J. Anat.*, 186: 417-429, 1989.

* De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas

Referências bibliográficas: NB-66. In: Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. P. 13-20

Serial sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1987.

Alberto-Rincon, M. C.; Paiva, C. S.; Abrahamsohn, P. A.; Zorn, T. M. T.
Histochemical Demonstration of Phospholipid Containg Choline in
the Cytoplasm of Murine Decidual Cell. *Acta Anat.* **150**:119-126,
1994.

Arslan, A. & Zingg, H. H. Regulation of gene expression in rat uterus in
vivo and in vitro. *Prostaglandins*, **52**: 463-81, 1996.

Banschbach, M. W.; Geison, R. L.; Hokin-Neaverson, M. Effects of
cholinergic stimulation on levels and fatty acid composition of
diacylglycerols in mouse pancreas. *Biochim. Biophys Acta*, **663**: 34-
45, 1981.

Besterman, J. M.; Duranio, V.; Cuatrecasas, P. Rapid formation of
diacylglyceror from phosphatidylcholine: a pathway for generation
of a second messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 6785-6789,
1986.

Biden, T. J.; Prentki, M.; Irvine, R. F.; Berridge, M. J.; Wollheim, C. B.
Inositol 1,4,5-triphosphate mobilizes intracellular Ca^{++} from
permeabilized insulin-secreting cells. *Biochem. J.*, 223: 467-473,
1984.

Biggers, J.D.; Leonor, B. V.; Baskar, J. F.; Fried, J. Inhibition of hatching
of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists. *Biol.*
Reprod., 19: 519-533, 1978.

Billah, M. M.; Lapetinga, E. G.; Cuatrecasas, P. Phospholipase A2 and
phospholipase C activities of platelets. Differential substrate
specificity Ca^{++} requirements, pH dependence and cellular
localization. *J. Biol. Chem.*, 255: 10227-10231, 1980.

Bill, T. K.; Smith, J. B. & Silver, M. J. Selective release of arachidonic acid
from the phospholipids of human platelets in response to
thrombin. *J. Clin. Invest.*, 60: 1-6, 1977.

Bogliolo, L. Patologia. Guanabara-Koogan, 5ª ed., pp. 11-145, Rio de Janeiro, 1994.

Broekman, M. J.; Ward, J. W. & Marcus, J. Phospholipid metabolism in stimulated platelets. Changes in Phosphatidylinositol phosphatidic acid and lysophospholipids. J. Clin. Invest., 66: 275-283, 1980.

Brokelmann, D. & Biggers, J. D. Studies on the development of cell contacts and of the intercellular matrix during decidualization in the rat. Archs Gynecol., 227: 103-117, 1979.

Campbell, W. B. Lipid-derived autacoids: Eicosanoids and platelet-activating factor. In: Gilman AG, TW Rall, AS Mies, P. Taylor (eds): Goodman and Gilman's. Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, Pergamon Press, pp: 600-617, 1990.

Carstem, M. E. & Miller, J. D. Ca^{++} release by inositol triphosphate from Ca^{++} transporting microsomes derived from uterine sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys. Acta*, 130: 1027-1031, 1985.

Cejic, S. S. & Kennedy, T. G. Effects of piriprost (U-60, 257B) and leukotrienes on alkaline phosphatase activity of rat endometrial atromal cells *in vitro*. *Prostaglandins*, 42: 163-177, 1991

Chakraborty, I.; Das, S. K.; Dey, S. K. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-2 genes in peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J. Mol. Endocrinol.*, 16: 107-122, 1996.

Colard, O. ; Breton, M.; Bereziat, G. Arachidonate mobilization in diacyl, alkylacyl and alkenylacyl phospholipids, on stimulation of rat platelets by thrombin and Ca^{++} ionophore A 23187. *Biochem. J.*, 233: 691-695, 1986.

Cole, O. F.; Seki, H.; Elder, M. G.; Sullivan, M. H. Interleukin-1 beta independently stimulates production of prostaglandin E2 and Cyclic AMP from human decidual cells.. *Biochim Biophys Acta*, 1269: 139-144, 1995.

Coussens, L.; Parker, P. J.; Rhee, L.; Yang-Feng, T. L.; Waterfield, E.; Chen, M. D.; Francke, U.; Ulrich, A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science Wash. DC.*, 233: 859-866, 1986.

Coussens, L.; Rhee, L.; Parker, P. J.; Ullrich, A. Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA* 6: 389-394, 1987.

Devlin, T. M. *Textbook of Biochemistry*. Wiley-Liss, 3^a ed. Pp. 461-473, New York, 1994.

Dixon, J. F. & Hokin, L. E. Secretagogue-stimulated phosphatidylinositol breakdown in the exocrine pancreas liberates arachidonic acid, stearic acid, and glycerol by sequential actions of phospholipase C and diacylglycerol lipase. *J. Biol. Chem.*, 259: 14418-14425, 1984.

Dvorak, A. M.; Dorak, M. F.; Peters, S. P.; Shulman, E. S.; Magg-Lashan, D. W.; Pynke, K.; Harugy, V. S.; Galli, S. J. & Lichtenstein, L. M. Lipids bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J. Immunol.*; 131: 2965-2976; 1983.

Dewitt, D. & Smith, W. L. Yes, but do they still get headaches? *Cell*, 83: 345-348, 1995.

Farese, R. V.; Konda, T. S.; Davis, J. S.; Standdaert, M. L.; Pollet, R. J.; Cooper, R. Insulin rapidly increases diacylglycerol by activating de novo phosphatidic acid synthesis. *Science Wash. D. C.*, 236: 586-589, 1987.

Fenwick, L.; Jones, R. L.; Naylor, B.; Poyser, N. L. & Wilson, N. M.
Production of prostaglandins by the pseudopregnant rat uterus,
in vitro, and the effect of tamoxifen with the identification of 6-
keto-prostaglandin F12 as a major product. *Br. J. Pharmacol.*, 59:
191-99, 1977.

Finn, C. A. & Porter, D. G. *The uterus*. London, Elek Science, 1975.

Flint, A.P.F.; Leat, W. M. F.; Sheldrick, E. L.; Stewart, H. J. Stimulation of
phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which
oxytocin controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium.
Biochem. J., 237: 797-805, 1986.

Fuentes, A.; Spaziani, E. P.; O'Brien, W. F. The expression of
cyclooxygenase-2 (COX-2) in amnion and decidua following
spontaneous labor. *Prostaglandins*, 52: 261-7, 1996.

Gemsa, D.; Leser, H. G.; Seitz, M.; Deimann, W.; Bärlin, E. Membrane perturbation and stimulation of arachidonic acid metabolism. *Mol. Immunology*, 19: 1287-1296, 1982.

Glasser, S. R.; Lampelo, S.; Munir, M. I.; Julian, S. ^a Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cell. *Differentiation*, 35: 132-42, 1987.

Glasser, S. R. and Julian, J. A. Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. *Biol. Reprod.*, 35: 463-474, 1986.

Gupta, A.; Huet, Y. M. & Dey, S. K. Evidence for prostaglandins and leukotrienes as mediators of phase I estrogen action in implantation in the mouse. *Endocrinol.*, 124: 546-548, 1989.

Guynton, A. C. Metabolismo Lipídico. In: Tratado de Fisiologia Médica
Ed. Guanabara, 7ª Edição p. 653, 1989

Hadler, W. A. & Silveira, S. R. Histochemical technique to detect
choline-containing lipids. *Acta Histochem.*; 63: 265-270, 1978

Hamilton, G. S. & Kennedy, T. G. Uterine extracellular fluid volume and
blood flow after artificial uterine stimulation to rats differentially
sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 48: 910-915,
1983.

Irvine, R. F. How is the level of free arachidonic acid controlled in
mammalian cells *Biochem. J.*, 204:3-16, 1982.

Ishihara, O.; Khan, H.; Sullivan, M. H. F.; Elder, M. G. Interleukin-1beta
stimulates decidual stromal cell cyclooxygenase enzyme and
prostaglandin production. *Prostaglandins*, 44: 43-52, 1992.

Jollie, W. P. & Benscosme, S. A. Electron microscopic observations on primary decidua formation in the rat. *Am. J. Anat.*, 116: 217-36, 1965.

Jones, R. L.; Kelly, R. W.; Critchley, H. Q. D. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Human Reproduction*, 12 (6): 1300-1306, 1997.

Joseph, S. K.; Thomas, A. P.; Williams, R. J.; Irvine, R. F.; Williamson, J. R. Myo-inositol 1,4,5-triphosphate. A second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{++} in liver. *J. Biol. Chem.*, 259: 3077-3081, 1984.

Keenen, R. W. & Hokin, L. E. The positional distribution of the fatty acids in phosphatidylinositol. *Biochim. Biophys. Acta*, 84: 458-460, 1964.

Kennard, E. A.; Zimmerman, P. D.; Friedman, C. I.; Kniss, D. A.
Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 in cultured human
decidual cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 65-71, 1995.

Kennedy, T. G. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation
of blastocyst implantation in rat., *Biol. Reprod.* 16: 286-291,
1977.

Kennedy, T. G. Prostaglandins and the endometrial vascular
permeability changes preceding blastocyst implantation and
decidualization. *Prog. Reprod. Biol.*, 7: 234-243, 1980.

Kennedy, T. G. & Lukash, L. A. Induction of decidualization in rats by
the infusion of prostaglandins. *Biol. Reprod.*, 27: 253-260, 1982.

Kennedy, T. G. Prostaglandin E2 adenosine 3'5'-monophosphate and
changes in endometrial vascular permeability in rat uteri
sensitized for the decidual cell reaction. *Biol. Reprod.*, 29: 1069-
1076, 1983.

Kennedy; T, G. Evidence for the involvement of prostaglandins throughout the decidual reaction in the rat. *Biol. Reprod.* 33: 110-146, 1985.

Kennedy, T. G. Prostaglandins and the uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 476: 43-48, 1986.

Kennedy, T. G. Eicosanoids and blastocyst implantation. In *Eicosanoids and Reproduction* pp 123-138 Ed. MD Mitchell. CRC Press, Boca Raton, 1990.

Kennerly, D. A. Diacylglycerol metabolism in mast cells. *J. Biol. Chem.*, 262: 16305-16313, 1987.

Keys, J. L. & Kennedy, T. G. Effects of indomethacin and prostaglandin E2 on structural differentiation of the rat endometrium during artificially induced decidualization. *Am. J. Anat.*, 188:148-162, 1990.

Kikkawa, U. & Nishizuka, Y. The role of protein Kinase C in transmembrane signalling. *Annu. Ver. Cell. Biol.*, 2: 149-178, 1986.

Kinohita, K.; Satch, K.; Sakamoto, S. Biosynthesis of prostaglandins in human decidua, amnion, chorion and villi. *Endocrinol. Jpn.*, 24: 343-350, 1977.

Kleinfeld, R. G. & O'Shea, J. D. Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol. Reprod.*, 28: 691-702, 1983.

Kniss, D. A.; Zimmerman, P. D.; Garver, C. L.; Fertel, R. H. Interleukin-1 receptor antagonist blocks interleukin-1-induced expression of cyclooxygenase-2 in endometrium. *Am. J. Obstet. & Gynecol.*, 177: 559-567, 1997.

Knopf, J. L.; Lee, M. H.; Sultzman, L. A.; Kriz, R. W.; Loomis, C. R.;
Hewick, R. M. Cloning and expression of multiple protein Kinase C
CDNAs. *Cell*, 46: 491-502, 1986.

Krehbiel, R. M. Cytological studies of the decidul reaction in the rat
during early pregnancy and the production of deciduomata.
Physiol. Zool., 10: 212-33, 1937.

Krug, E. C.; Rogol, A. D.; Jarvis, W. D. Thiagarajah, S.; Singhas, C. A.
Prolactin secretion by human chorion-decidua in vitro: influences
of mode of delivery and agents that modify prostaglandins
synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147: 38-42, 1983.

Lacal, J. C.; Moscat, J. and Aaronson, A. Novel source of 1,2-
diacylglycerol elevated in cells transformed by Há-ras oncogene.
Nature Lond., 330: 269-272, 1987.

Lala, P. K.; Kennedy, T. G.; Parhar, R. S. Supression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua: II. Characterization of the supressor mechanisms. *Cel. Immunol.*, 116: 411-422, 1988.

Lands, W. E. M. & Samuelsson, B. Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta*, 164: 426-429, 1968.

Lapetinga, E. G.; Billah, M. M.; Cuatrecasas, P. The initial action of thrombin on platelets. Conversion of phosphatidylinositol to phosphattidic acid preceding the production of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, 256: 5037-5040, 1981

Lejeune, B., J. Van Hoeck, and F. Leroy Trasmmitter role of the luminal uterine epithelium in thr induction of decidualization in rats. *J. Reprod. Fertil.*, 61: 235-240, 1981.

Litosch, I.; Saito, Y.; Fain, J. N. . 5-HT-arachidonic acid release from labeled phosphatidylinositol in blowfly salivary glands. *Am. J. Physiol.* 243 (Cell Physiol. 12): c222-c226, 1982.

Magnaldo, I. ; L'Allemain, G.; Chambard, J. C.; Moenner, M.; Barritault, D.; Pouyssegur, J. The mitogenic signalling pathway of fibroblast growth factor is not mediated through polyphosphoinositide hydrolysis and protein kinase C atuation in hamster fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 261: 16916-16922, 1986.

Mahadevapa, V. G. & Holub, B. J. Degradation of different molecular species of phosphatidylinositol in thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.*, 258: 5337-5339, 1983.

Mahadevapa, V. G. & Holub, B. J. Relative degradation of different molecular species of phosphatidylcholine in thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.*, 259: 9369-9373, 1984.

Majerus, P, W.; Neufeld, E. J.; Wilson, D. B. Production of phosphoinositide-derived messengers. *Cell*, 37: 701-703, 1984.

Majerus, P, W.; Connolly, T. M.; Bansal, V. S.; Inhorn, R. C.; Ross, T. S.; Lips, D. L. Inositolphosphates: Synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.*, 263: 3051-3054, 1988.

McManus, J. F. A. & Mowry, R. W. *Staining Methods: Histological and Histochemical*. Hober, New York. Pp. 143-162, 1960.

Mitchell, M. D.; Romero, R. J.; Edwin, S. S.; Trautman, M. S. Prostaglandins and parturition. *Reprod fertil Dev.*, 7: 623-32, 1995.

Michell, R. H. Inositol Phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta*. 415: 81-147, 1975.

- Moncada, S.; Flower, R. J.; Vane, R. J. Prostaglandinas, Prostaciclina, Tromboxano A₂ e leucotrienos in: As bases farmacológicas da terapêutica. Goodman Gilmaud et al. Ed, 1987, Rio de Janeiro (RJ).
- Moulton, B. C. & Blaha, G. C. Separation of deciduoma cells by velocity sedimentation at unit gravity. *Biol. Reprod.*, 18: 141-147, 1978.
- Ohno, S.; Kawasaki, H.; Imajoh, S.; Suzuki, K. Tissue specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature Lond.*, 325: 161-166, 1987.
- Okazaki, T.; Sagawa, N.; Okita, J. R.; Bleasdale, J. E.; Mac Donald, P. C.; Johnston, J. M. Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J. Biol. Chem.*, 256: 7316-7321, 1981a.

Okazaki, T.; Casey, M. L.; Okita, J. R.; Mac Donald, P. C.; Johnston, J. M.
Initiation of human parturition XII. Biosynthesis and metabolism
of prostaglandins in human fetal membranes and decidua. *Am. J.*
Obstet. Gynecol., 139: 373-385, 1981b.

O'Rourke, F. A.; Halenda, S. P.; Zavoico, G. B.; Feinstein, M. B. Inositol
1,4,5 triphosphate release Ca^{++} from a Ca^{++} -transporting
membrane vesicle fraction derived from human platelets. *J. Biol.*
Chem., 260: 956-962, 1985.

Parker, P. J.; Coussens, L.; Totty, N.; Rhee, L.; Young, S.; Chen, E.; Stabel,
S.; Waterfield, M. D.; Ulrich, A. The complete primary structure of
protein kinase C - The major phorbol ester receptor. *Science Wash.*
DC, 233: 853-859, 1986.

Parr, M. B.; Tung, M. N. & Parr, E. L. The ultrastructure of the rat
primary decidual zone. *Am. J. Anat.*, 176:423-436, 1986.

Parhar, R. S.; Yagel, S.; Lala, P. K. PGE-2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in decidua with potential anti-trophoblast activity. *Cel. Immunol.*, 120: 61-74, 1989.

Philips, C. A. & Poyser, N. L. Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat. *J. Reprod. Fertil.*, 62: 73-81, 1981.

Putney, J. W., Jr. Recent hypothesis regarding the phosphatidylinositol effect. *Life Sci.*, 29: 1183-1194, 1981.

Psychoyos, A. Perméabilité et la décidualisation utérine. *C. R. Seances Acad Sci. (Paris)* 252: 1515-7, 1961.

Psychoyos, A. In: *Handbook of Physiology* (R.O. Greep, E.B. Astwood and S.R. Geiger, eds) American Physiological Society, Bethesda, Sect. 7, Vol. II, Part 2, p. 187 - 1973.

Rana, R. S.; Hokin, L. E. Role of phosphoinositides in transmembrane signalling. *Physiol. Rev.*, 70: 115-163, 1990.

Rittenhouse, S. T. Inositol lipid metabolism in the responses of stimulated platelets. *Cell Calcium*, 3: 311-322, 1982.

Romero, R.; Mazar, M.; Wu, Y. K.; Avila, C.; Oyarzun, E.; Mitchell, M. D. Bacterial endotoxin and tumor necrosis factor stimulate prostaglandin production by human decidua. *Prostagl. Leukotr. And Essent. Fatty Acids*, 37: 183-186, 1989.

Rosoff, P. M.; Savage, N.; Dinarello, C. A. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol by a novel mechanism. *Cell*, 54: 73-81, 1988.

Rubin, R. P. Calcium Phospholipid interactions in secretory cells: a new perspective on stimulates secretion coupling. *Federation Proc.*, 41: 2181-2187, 1982.

- Sananès, N.; Baulien, E. E. & Le Goascogne, C. Prostaglandin(s) as an inductive factor of decidualization in the rat uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 6: 153-58, 1976.
- Schafer, W. R.; Zahradnik, H. P.; Arbogast, E.; Wetzka, B.; Werner, K.; Breckwoldt, M. Arachidonate metabolism in human placenta, fetal membranes, decidua and myometrium: lipoxygenase and cytochrome P450 metabolites as main products in HPLC profiles. *Placenta*, 17: 231-8, 1996.
- Schrey, M. P.; Read, A. M.; Steer, P. J. Stimulation of phospholipid hydrolysis and arachidonic acid mobilization in human uterine decidua cells by phorbol ester. *Biochem. J.*, 246: 705-713, 1987.
- Shelesnyak, M. C. Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. *Am. J. Physiol.*, 170: 522-527, 1952.

- Streb, H.; Bayerdorffer, E.; Haase, W.; Irvine, R. F.; Schulz, I. Effect of inositol 1,4,5-triphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J. Membr. Biol.*, 81: 241-253, 1984.
- Trautman, M. S.; Edwin, S. S.; Collmer, D.; Dudley, D. J.; Simmons, D.; Mitchell, M. D. Prostaglandin H synthase-2 in human gestational tissues: regulation in amnion. *Placenta*, 17: 239-45, 1996.
- Tung, H. N.; Parr, M. B.; Parr, E. L. The permeability of the primary decidual zone in the uterus: An ultrastructural tracer and freeze-fracture study. *Biol. Reprod.*, 35: 1045-1058, 1986.
- Weibel, E. R.; *Stereological Methods Vol. 1-Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, New York, 1979.
- Woodgett, J. R. & Hunter, T. Isolation and characterization of two distinct forms of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 262: 4836-4843, 1987.

Van Den Bosch, H. Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta*, 604: 191-246, 1980.

Vane, J. R. inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235, 1971.

Vonkeman, H. & Van Dorp, D. A. The action of prostaglandin synthetase on 2-arachidonyl-lecithin. *Biochim. Biophys. Acta*, 164: 430-432, 1968.

Yang, Z. M.; Das, S. K.; Wang, J.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A.; Dey, S. K. Potential sites of prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes. *Biol. Reprod.*, 56: 368-379, 1997.

Yousufzai, S. Y. K. & Abdel-Latif, A. A. The effects of α 1-adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation on prostaglandin release by rabbit iris. *Prostaglandins*, 28: 399-415, 1984.

Zorn, T. M. T.; Bevilacqua, E. M. A. F.; Abrahamsohn, P. A. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell Tissue Res.*, 244: 443-8, 1986.

Zorn, T. M. T.; Oliveira, S. F. and Abrahamsohn, P. A. Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidual cells. *J. Struct. Biol.*, 103: 23-33, 1990.