



**CRISTIANE REGINA CORRÊA DA SILVA**

**ESTUDO CITOQUÍMICO E IMUNOCITOQUÍMICO  
DAS CÉLULAS GRANULOSAS METRIAIS EM  
ÚTEROS DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)  
PRENHES**

**Campinas  
1997**

**Si38e**

**32217/BC**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MORFOLOGIA

ESTUDO CITOQUÍMICO E IMUNOCITOQUÍMICO DAS  
CÉLULAS GRANULOSAS METRIAIS EM ÚTEROS DE  
CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) PRENHES

CRISTIANE REGINA CORRÊA DA SILVA

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
*Cristiane Regina Corrêa da Silva*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

18/08/97 *[Assinatura]*

Tese de Mestrado apresentada no  
Instituto de Biologia/UNICAMP  
para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas - Área de  
Concentração em Morfologia

Orientador: PROF. DR. ÁUREO TATSUMI YAMADA

Campinas  
1997

9421796



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/unicamp
	Si 38e
V.	Ex.
TOMBO BC/	32217
PROC.	285197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	25/11/97
N.º CPD	

CM-00103058-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

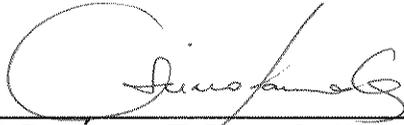
Silva, Cristiane Regina Corrêa da  
Si38e. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células  
granulosas metriais em úteros de camundongos (*Mus  
musculus*) prenhes / Cristiane Regina Corrêa da Silva.--  
Campinas, SP: [s.n.], 1997  
f. 71 ilus.

Orientador: <sup>Áureo T. Yamada</sup> Áureo T. Yamada  
Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Endométrio. 2. Citoquímica. 3. Catepsina. I.  
Yamada, Áureo T. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III.. Título.

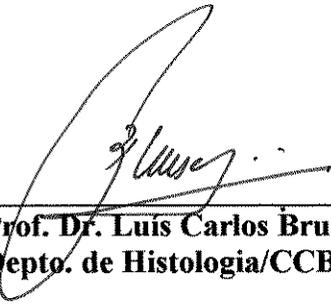
Defesa de Tese realizada em 18//08/1997

**Banca Examinadora**



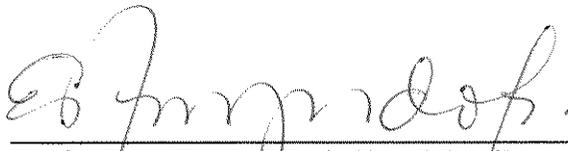
---

**Prof. Dr. Aureo T. Yamada (Orientador)**  
**Depto. de Histologia e Embriologia/IB-UNICAMP**



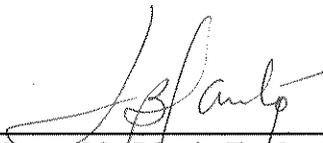
---

**Prof. Dr. Luis Carlos Bruschi**  
**Depto. de Histologia/CCB-UEL**



---

**Profa. Dra. Estela Maris Forell Beyilacqua**  
**Depto. de Histologia e Embriologia/ICB-USP**



---

**Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**  
**Depto. Microbiologia e Imunologia/IB-UNICAMP**  
**(Membro suplente)**

*Dedico este trabalho*

*aos meus pais, José e Ivanir,*

*pelos princípios que me deram*

*e me fizeram ser o que sou.*

*Agradecimento especial*

*Ao meu noivo **Eduardo**, pela paciência, cumplicidade, amor,*

*e por estar presente em todos os momentos deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada por ter me recebido e orientado, segura e eficientemente.**

**Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Morfologia, do Instituto de Biologia/UNICAMP, por ter me acolhido e possibilitado a execução deste trabalho.**

**Aos professores do Departamento de Histologia/CCB/UEL pelo exemplo de profissionalismo acadêmico, apoio e incentivo.**

**Ao Departamento de Histologia/CCB/UEL pelo afastamento concedido.**

**Aos Membros da pré-banca, Prof. Dra. Estela Maris Forell Bevilacqua, Prof. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos e Prof. Dr. Luis Carlos Bruschi pela leitura da versão inicial da tese e sugestões para o aprimoramento da mesma.**

**À Profa. Dra. Célia Guadalupe T. de Jesus Andrade pelas sugestões e amizade.**

**Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro pelo auxílio e incentivos.**

**À Prof. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon pela colaboração e preocupação.**

**Ao Prof. José Antônio Rossi, meu primeiro mestre.**

**À Profa. Neila Recanelo Arrebolla, pela amizade, chefia e colaboração.**

**Aos colegas de Pós Graduação Júlio de Mello Neto, Patrícia Aline B. de Lima, Patrícia D. Costa, Rosa Ema W. Serrano, Andréa M. do Amarante, Carmem Lúcia B. Ferraz de Lima, pelos momentos compartilhados.**

**Aos funcionários Baltazar Pereira de Paula, Marta Almeida, Marta Beatriz Leonardo, Silvia Helena Moda, Antônia Maria Ferreira Lima, e especialmente à Cleusa de Oliveira Franco pelo inestimável auxílio técnico.**

**Às secretarias Helena, Rita e Vânia, que por diversas maneiras colaboraram para a realização deste trabalho.**

**À todos os docentes do Depto. de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia-UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas.**

**Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP pelo apoio técnico e uso de seus equipamentos.**

**Ao Departamento de Histologia e Embriologia do ICB/USP pela utilização do seu microscópio eletrônico.**

**Ao Departamento de Patologia da FCM/USP pela utilização do seu microscópio eletrônico.**

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa.**

**Aos meus amigos e familiares, que mesmo não entendendo a complexidade deste trabalho, sempre souberam incentivar e apoiar a realização do mesmo.**

**Por fim, à todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.**

# SUMÁRIO

Ítems	Páginas
<b>. RESUMO</b> -----	i
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	1
<b>1.1. Características gerais das células granulosas metriais</b> -----	2
<b>1.2. Semelhança entre células granulosas metriais e linfócitos         “natural-Killer”</b> -----	6
<b>1.3. Lectinas</b> -----	8
<b>1.4. Proteinases lisossômicas</b> -----	9
<b>2. OBJETIVOS</b> -----	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	15
<b>3.1. Animais</b> -----	16
<b>3.2. Processamento em parafina</b> -----	16
<b>3.3. Processamento para microscopia eletrônica de transmissão</b> -----	17
<b>3.3.1. Resina epóxi</b> -----	17
<b>3.3.2. Resina LR-White</b> -----	18
<b>3.4. Reações histoquímicas</b> -----	19
<b>3.4.1. PAS</b> -----	19
<b>3.4.2. Lectina DBA</b> -----	20
<b>3.5. Reação citoquímica da lectina DBA</b> -----	21
<b>3.6. Reação imunoistoquímica</b> -----	21
<b>3.7. Reação imunocitoquímica</b> -----	23

<b>4. RESULTADOS</b> -----	<b>24</b>
<b>4.1. Análise morfológica em microscopia fotônica</b> -----	<b>25</b>
<b>4.2. Análise ultra-estrutural</b> -----	<b>29</b>
<b>4.3. Análise histoquímica da lectina DBA</b> -----	<b>30</b>
<b>4.4. Análise citoquímica da lectina DBA</b> -----	<b>31</b>
<b>4.5. Análise imunoistoquímica</b> -----	<b>32</b>
<b>4.6. Análise imunocitoquímica</b> -----	<b>32</b>
<b>5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA</b> -----	<b>33</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> -----	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> -----	<b>52</b>
<b>. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>54</b>
<b>. ABSTRACT</b> -----	<b>iv</b>

## **RESUMO**

As Células Granulosas Metriais (CGMs) presentes em úteros de roedores prenhes, apresentam como característica morfológica principal, um citoplasma repleto de grânulos, que contêm além da perforina, hidrolases e proteases. Estes grânulos são PAS positivos. Apresentam também antígenos de superfície que as caracterizam como sendo da linhagem NK. Porém, os fatores que determinam a sua diferenciação no endométrio, a composição química de seus grânulos, relacionada com a função destas células durante a gestação, ainda não são totalmente conhecidos.

No presente trabalho foram utilizados camundongos prenhes no 9º, 11º, 13º, 15º e 17º dias de gestação (ddg), cujos fragmentos de sítios de implantação ou de placentas foram processados para inclusão em parafina, resina epóxi e resina LR-White. Estes materiais foram submetidos aos métodos histoquímicos e citoquímicos da lectina DBA (*Dolichos biflorus*), além da técnica de PAS, para a identificação e localização das CGMs. Foram ainda utilizados anticorpos policlonais anticatapsina D e B em métodos imunohistoquímicos e imunocitoquímicos para caracterizar a natureza lisossômica dos grânulos intracitoplasmáticos destas células.

As CGMs foram identificadas ao longo do período gestacional analisado, tanto pela técnica de PAS quanto pela lectina DBA, tendo esta última apresentado maior seletividade. Estas células foram localizadas predominantemente no endométrio decidualizado e não decidualizado, e em menor proporção no miométrio da região mesometrial. A histoquímica da lectina DBA mostrou marcação nos grânulos e na superfície celular, que foi confirmada ao nível ultra-estrutural. Baseado nos padrões morfológico e histoquímico foram classificados 4 subtipos de CGMs. A frequência destes subtipos variou no decorrer dos períodos analisados. Pelas reações imunocitoquímicas, as anticatapsinas D e B foram localizadas precisa e especificamente nos “caps” dos grânulos destas células.

Os quatro subtipos de CGMs identificados no endométrio gravídico de camundongos devem corresponder às fases de diferenciação destas células, as quais podem ser identificadas pela marcação da lectina DBA na superfície celular. A presença de formas precursoras de CGMs isentas de grânulos, concomitantemente com formas em aparente degeneração ao longo do período gestacional analisado, sugere que o endométrio gravídico seja determinante para a diferenciação desta população celular. A imunocitoquímica para os anticorpos anticatapsinas D e B demonstraram que

enzimas proteolíticas lisossômicas coexistem subcompartimentalizadas na região do “cap” dos grânulos das CGMs. A identificação destas enzimas proteolíticas pressupõe a sua atuação sinérgica com outros componentes líticos dos grânulos destas células.

**ABSTRACT**

The Granulated Metrial Gland cell (GMG) found in the pregnant rodents uterus is characterized by its cytoplasm fulfilled with PAS positive granules which contain perforin and hydrolytic enzymes. This cell also pursues surface antigens that identify it as natural killer cell lineage. However, the factors that determine the differentiation in the endometrium or, the biochemical composition of the granules related to the role of this cell during pregnancy remain to be elucidated.

In the present work was used mice uterine fragments on 9<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> and 17<sup>o</sup> days of pregnancy. These materials were processed for paraffin, epoxy resin and LR-White resin embedding. The specimens collected were further processed by PAS and *Dolichos biflorus* (DBA) lectin cytochemistry for GMG identification and localization. Immunocytochemistry for anti-cathepsin D and B was performed to characterize the lysosomal nature of the GMG granules at light and electron microscopies.

The GMGs were easily identified by both PAS and DBA-lectin methods, but the later showed higher specificity. These cells were localized predominantly in the decidualized and no-decidualized endometrium and a few in the miometrium of mesometrial region of pregnant uterus. DBA-lectin labeling was found on both granules and cells surface of the GMGs. Four subtypes of GMGs were identified based on the morphology and on the cytochemical reaction pattern. These subtypes were found in the uterus through the period analyzed. The immunocytochemistry localized the anti-cathepsins D and B inside the granules, namely over the peripheral electrodense cap area.

The 4 subtypes of GMGs found in the pregnant endometrium suggest that the differentiation steps of these cells that occurs from early post-implantation stage to peri-partum stage. Therefore, differentiation of GMGs seems to be committed to environmental changes of pregnant endometrium. The immunocytochemistry showed the cathepsin D and B localized in a peripheral cap of GMG granules. It suggests a special lysosomal compartment inside the granules and their proteolytic enzymes could act synergicly with another granular component on lysis of target cells.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Características gerais das células granulosas metriais (CGMs)

O desenvolvimento de um feto geneticamente diferente do organismo materno no ambiente uterino é considerado um aloenxerto bem sucedido. Imunologicamente, este é um fenômeno intrigante que vem merecendo atenção crescente nas pesquisas da biologia da reprodução. No estroma endometrial de roedores prenhes tem sido identificada uma população de células contendo grânulos (PEEL et al., 1983; BULMER et al., 1987; PARR et al., 1987; CROY et al., 1991a,b), que usualmente não é encontrada em útero não gravídico.

Nos estágios mais avançados da gestação, tais células granulosas aparecem principalmente na base do mesométrio, entre as células miometriais, próximas aos vasos sanguíneos de cada sítio de implantação. Esta região, anatomicamente denominada de triângulo mesometrial, é ocupada pela “glândula metrial” (PEEL, 1989). O termo “glândula metrial” foi utilizado por SELYE e MCKEOWN (1935) para designar a região onde acumulavam-se as células granulosas, e por esta localização, tais células foram denominadas de “Células Granulosas da Glândula Metrial” (CGMs) (SELYE e MCKEOWN, 1935; LARKIN e FLICKINGER, 1969; PEEL et al., 1983; BULMER et al., 1987; PARR et al., 1987; CROY et al., 1991a,b).

JENKINSON (1902) descreveu células em úteros de camundongos prenhes, que foram por ele denominadas de “células glicogênicas maternas”. Esta descrição coincide com a descrição das CGMs.

Em ratos, as CGMs são arredondadas ou ovóides, com aproximadamente 25 $\mu$ m de diâmetro, podendo alcançar até 50 $\mu$ m em camundongos. Normalmente, apresentam um núcleo único, arredondado ou ovóide, com nucléolo evidente, geralmente localizado na periferia da célula. No entanto, algumas células binucleadas também foram observadas (PEEL, 1989). O reconhecimento dessas células é realizado pelo uso do ácido periódico-reativo de Schiff, devido à grande quantidade de grânulos intracitoplasmáticos PAS positivos (WISLOCKI et al., 1957; BULMER e DICKSON, 1960; STEWART e PEEL, 1977; PEEL, 1989).

Ao nível da microscopia eletrônica, tanto CGMs de ratos (LARKIN e FLICKINGER, 1969; DIXON e BULMER, 1971; PEEL e BULMER, 1977), quanto de camundongos (STEWART e PEEL, 1977) apresentaram projeções citoplasmáticas

bem evidentes. Nenhum tipo de junção intercelular foi observada entre as CGMs, ou entre essas células e outros tipos celulares presentes no endométrio (PEEL, 1989).

Em comparação às células endometriais, o citoplasma das CGMs é bastante elétron-lúcido e apresenta freqüentemente retículo endoplasmático granular desenvolvido, ribossomos livres e polissomos (PEEL, 1989). Nas CGMs menores, o glicogênio encontra-se difusamente distribuído, enquanto nas células maiores esse polissacarídeo é encontrado concentrado na periferia e nas projeções citoplasmáticas. Centríolos encontram-se usualmente próximos à área ocupada pelos grânulos (PEEL, 1989).

Em CGMs de ratos, vesículas revestidas (“coated vesicles”) foram encontradas próximas à região do complexo de Golgi (LARKIN e CARDELL, 1971). Cisternas do complexo de Golgi, bem como numerosas vesículas foram encontradas próximas aos grânulos das CGMs. A localização destas vesículas e dos grânulos no citoplasma das CGMs, associada à variação de forma, tamanho e eletrodensidade dos grânulos, sugeriu que o complexo de Golgi estaria envolvido na formação dos grânulos. Fusão entre as pequenas vesículas ou destas com grânulos maiores podem levar ao acúmulo de membranas depositado na forma de figuras de mielina ou “caps” membranosos (PEEL, 1989).

A distribuição das CGMs em ratos e camundongos é bastante semelhante (STEWART e PEEL, 1977; PEEL, 1989). Essas células são raras em úteros virgens, persistem durante a gestação e diminuem em número próximo ao parto (PEEL, 1989). STEWART (1983), observando o 6º dia de gestação, descreveu células pequenas e basófilas, destituídas de grânulos, sugerindo que estas fossem formas precursoras das CGMs.

Segundo STEWART e PEEL (1980), provavelmente as CGMs alcançam seu número máximo, na glândula metrial, no 12º dia de gestação. Em preparações histológicas da glândula metrial, figuras de mitose foram freqüentemente observadas dentro da população das CGMs até aproximadamente o 14º dia de gestação (CROY, 1994). No entanto, próximo ao parto poucas CGMs são observadas, pois desaparecem do útero por um processo de morte celular semelhante ao processo de necrose (DELGADO et al., 1996). No parto, as CGMs remanescentes são provavelmente

descartadas juntamente com os componentes da placenta, uma vez que não são encontradas no útero pós-parto (DELGADO et al., 1996; GUIMOND et al., 1997).

Foram observadas imagens sugestivas da passagem das CGMs por entre as células endoteliais (STEWART e PEEL, 1978), bem como CGMs presentes na luz dos vasos sanguíneos da decídua e glândula metrial (STEWART e PEEL, 1978; DICKSON, 1980; STEWART e PEEL, 1980). As CGMs também foram encontradas nas lacunas ocupadas por sangue materno junto às células trofoblásticas gigantes, na camada de espongiotrofoblasto (STEWART, 1984; STEWART e PEEL, 1978; STEWART e PEEL, 1980) e em íntima associação com as células trofoblásticas que revestem externamente as traves celulares da camada labiríntica da placenta (STEWART e PEEL, 1978; STEWART e PEEL, 1980; STEWART, 1990).

PEEL et al. (1983) demonstraram que as CGMs de ratos e camundongos são oriundas da medula óssea. As células precursoras das CGMs são pequenas, destituídas de grânulos e pertencentes à linhagem linfocitária (PEEL, 1989). À medida que se diferenciam, estas células tornam-se maiores, adquirem grânulos, e estes aumentam tanto em tamanho quanto em número ao longo da gestação. Esses grânulos são envoltos por membranas e possuem em média 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro (PEEL et al., 1983; PEEL, 1989).

As CGMs presentes em decíduomas de ratos e camundongos pseudográvidos parecem ser morfológicamente semelhantes àsquelas presentes na decídua (VELARDO et al., 1953; ELLIS, 1957; PEEL et al., 1979; MITCHELL et al., 1981; STEWART, 1985; MITCHELL e PEEL, 1986). No entanto, não existem informações precisas sobre a função desempenhada por essas células no decíduoma.

Tanto a morfologia, quanto a distribuição dessas células, bem como outras células análogas às CGMs, foram descritas em ratos e camundongos (DIXON e BULMER, 1971; STEWART e PEEL, 1977 e 1978; PEEL, 1989), hamster (BULMER et al., 1983), camundongos selvagens (*Apodemus sylvaticus*) (STEWART e CLARKE, 1995) e cobaias (DEBOUT e IZARD, 1994).

Os grânulos intracitoplasmáticos das CGMs de camundongos apresentaram duas regiões morfológicamente distintas: uma área central eletrodensa e outra periférica, contendo microvesículas membranosas. O acúmulo periférico destas microvesículas forma capuzes (“caps”) membranosos em camundongos e figuras de

mielina em ratos (STEWART e PEEL, 1977). Esta característica dos grânulos representa a principal diferença morfológica entre as CGMs de ratos e de camundongos (STEWART e PEEL, 1977; PEEL, 1989).

DELGADO et al. (1996) mostraram, através de cortes seriados, que o “cap” de um determinado grânulo é sempre periférico e situado na mesma posição. Mostraram, também, que a variação de tamanho entre os grânulos de uma mesma célula deve-se ao plano de corte.

Além dessas enzimas, os grânulos das CGMs também contêm glicoproteínas, PAS positivas e resistentes à diastase (WISLOCKI et al., 1957; BULMER e DICKSON, 1960; STEWART e PEEL, 1977). STEWART e PEEL (1977) detectaram variações na intensidade de reação ao PAS nos grânulos de uma mesma célula. Esses grânulos apresentam metacromasia quando corados com azul de toluidina (WISLOCKI et al., 1957). Estudos histoquímicos demonstraram a presença de muitas enzimas hidrolíticas nos grânulos das CGMs, tais como  $\beta$ -glucuronidase (BULMER, 1963), esterase não específica e fosfatase ácida (BULMER, 1965), arilsulfatase e aminopeptidase (BULMER, 1968a,b).

As CGMs também contêm em seus grânulos uma proteína lítica, a perforina (PARR et al., 1987; PARR et al., 1990b; ZHENG et al., 1991a,b), usualmente encontrada em grânulos de linfócitos T citotóxicos (GROSCURTH et al., 1987; TSCHOPP e NABHOLZ, 1990) e células NK (YOUNG et al., 1986 e 1990).

As CGMs são capazes de destruir algumas células placentárias “in vitro” (STEWART e MUKHTAR, 1988; PEEL e ADAM, 1991). STEWART (1990) também sugere que essas células, podem lisar as células trofoblásticas “in vivo”. Segundo este autor, algumas CGMs atingem a placenta fetal, onde interagem com um pequeno número de células trofoblásticas, que estão voltadas para o sangue materno no labirinto, lisando-as.

ZHENG et al. (1993) não observaram diferença no número de células ou no nível de perforina entre os casos de aborto e as placentas saudáveis. Estes resultados levaram esses autores a sugerirem que as CGMs perforina-positivas não estariam envolvidas na maioria dos casos de aborto. STALLMACH et al. (1995) demonstraram, em úteros de camundongos perforina-deficientes, que a presença da perforina não seria necessária para o sucesso da gestação.

Assim sendo, a função da perforina em úteros prenhes ou mesmo os mecanismos que possam estar envolvidos na degranulação das CGMs ainda não estão completamente definidos.

## **1.2. Semelhança entre células granulosas metriais (CGMs) e linfócitos “natural-killer” (NK)**

As imunomarcações realizadas nas células leucocitárias no endométrio de roedores têm estabelecido que existem tanto células linfocitárias da linhagem T (STOUT et al., 1987; RYAN et al., 1991; VICARI e ZLOTNIK, 1996), quanto NK (KASAI et al., 1980; CHAMBERS et al., 1989; RYAN et al., 1991; GOSSELIN et al., 1993). No caso particular das células granulosas metriais, estas células apresentam marcação positiva para os antígenos Asialo-GM1, Thy-1 e NK1.1 (MUKHTAR et al., 1989; REDLINE e LU, 1989; LINNEMEYER e POLLACK, 1991), caracterizando a sua semelhança com as células NK. Porém, alguns autores identificaram células positivas para CD8 em ratos (HEAD et al., 1994; HEAD, 1996), sugerindo que existem populações de células contendo grânulos de origem linfocitária da linhagem T.

PARR et al. (1987) demonstraram a presença da perforina no interior das CGM, caracterizando estas células com possível ação lítica à semelhança das células linfocitárias NKs. ZHENG et al. (1991a,b) também encontraram a perforina no interior dos grânulos das CGMs e sugeriram que estas últimas pertencessem à linhagem das células NK. Porém, dúvidas quanto à origem destas células permaneceram, uma vez que OJCIUS et al. (1991) demonstraram, por imunomarcação, que os grânulos de linfócitos T citotóxicos (CTL) possuem perforina e serina esterase, permitindo a interpretação de que as CGMs pertencessem à linhagem dos linfócitos T citotóxicos.

Da mesma forma, as células NK de ratos também contêm perforina e apresentam três tipos de grânulos estruturalmente distintos (BURKHARDT et al., 1990). Segundo esses autores, cada tipo possui diferentes proporções de área central eletrodensa e de área multivesicular periférica que, por sua vez, comportam-se como dois compartimentos distintos, com diferente composição. Na área central eletrodensa foram detectadas proteínas secretoras que participam da citólise, incluindo perforina (BLUMENTHAL et al., 1984; PODACK et al., 1985) e condroitina sulfato

(MACDERMOTT et al., 1985). Nas áreas vesiculares periféricas, no entanto, têm sido descritas hidrolases lisossômicas, incluindo fosfatase ácida, arilsulfatase,  $\beta$ -glucuronidase (FREY et al., 1982; ZAGURY, 1982; ZUKER-FRANKLIN et al., 1983) e catepsina D (BURKHARDT et al., 1990). A existência desses dois compartimentos distintos nos grânulos das NK de ratos, sugere que estas possam desempenhar uma função mista de secreção e de atividade lisossômica (BURKHARDT et al., 1990).

Durante a última década, têm aumentado as evidências genéticas e imunológicas indicativas de que as CGMs são membros da linhagem NK (ZHENG et al., 1991c; CROY e KISO, 1993; CROY et al., 1996; HEAD, 1996). Com a utilização de camundongos transgênicos T e B deficientes, demonstrou-se que as CGMs mantinham-se no útero gravídico e apresentaram frequência, morfologia e localização semelhantes aos camundongos não imunodeficientes (CROY et al., 1996). Tais evidências confirmam, então, que as CGMs não seriam células da linhagem T ou B, mas sim da linhagem NK (CROY et al., 1996; HEAD, 1996; POLLACK e LINNEMEYER, 1996).

Porém, existem características que distinguem células NK de CGMs, uma vez que as primeiras produzem INF-gama e são estimuladas por ele, enquanto não existem evidências de produção de INF-gama pelas CGMs, mas sim da expressão, de receptores dos mesmos (CROY e KISO, 1993; CROY et al., 1996). As CGMs produzem IL-1, CSF-1, LIF e TNF- $\alpha$  (CROY et al., 1991a; CHEN et al., 1993; CROY et al., 1996) e possuem receptores para IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN-gama (CROY et al., 1991a; CHEN et al., 1993; VANDEN et al., 1996; CROY et al., 1996).

Segundo YE et al. (1996), a IL-15 apresenta um importante papel na indução e regulação da diferenciação das CGMs em úteros de roedores grávidos, sendo produzida pelos macrófagos presentes no estroma uterino. Estes mesmos autores sugerem que a IL-2 não esteja envolvida na diferenciação das CGMs, como acontece com as células NK. Outra característica importante das células NK é sua capacidade de lisar “in vitro” células de mieloma Yac-1, em ratos e camundongos (TRINCHIERI, 1989; STEWART, 1991). Porém, as CGMs de camundongos não apresentam tal atividade (CROY e KASSOUF, 1989; PARR et al., 1990a; CROY et al., 1991b; HEAD, 1996).

Os dados acima ressaltam tanto as semelhanças existentes entre as linhagens NK e CGM quanto as suas diferenças. No entanto, na tentativa de se estabelecer as funções desempenhadas pelas CGMs no útero gravídico, pode-se recorrer aos conhecimentos disponíveis das células NK de outros tecidos.

Baseado nas semelhanças com as NK, presume-se que três grandes propriedades das células NK também poderiam ser atribuídas às CGMs, quais sejam: a participação na produção e resposta a citocinas (CROY et al., 1991a; HUNT, 1994; CROY, 1994), a produção de componentes da matriz extracelular e a interação com os mesmos (BRAGA e GENDLER, 1993; SANTONI et al., 1989; GINSBURG et al., 1989; CROY, 1994) e a interação com as células alvo para sua lise (CROY et al., 1991b; LINNEMEYER e POLLACK, 1991; CROY, 1994).

Essas funções possivelmente compartilhadas pelas NK e CGMs têm levado a uma diversidade de denominação dessa células na literatura. Alguns autores referem-se às CGMs como células NK-like (PARR et al., 1987; ZHENG et al., 1991c; LINNEMEYER e POLLACK, 1991; CROY e KISO, 1993) e mais recentemente como células NK uterinas (DELGADO et al. 1996; CROY et al., 1996; HEAD, 1996; POLLACK e LINNEMEYER, 1996).

### **1.3. Lectinas**

As lectinas pertencem a uma classe de proteínas que podem combinar-se rápida, seletiva e reversivelmente com açúcares específicos. Podem ser de origem animal, vegetal ou bacteriana. Apresentam especificidade não apenas para diferentes oligossacarídeos, como também para monossacarídeos (SHARON e LIS, 1993).

Devido a esta propriedade, as lectinas têm sido muito utilizadas em técnicas histoquímicas que possibilitam a identificação e localização de células, tanto em tecidos normais, quanto naqueles patologicamente alterados (FREEMAN, 1983; LEE e DAMJANOV, 1984; SHARON e LIS, 1993).

Os estudos que utilizam a histoquímica de lectinas também permitem detectar variação na expressão de glicoconjugados decorrentes do estado funcional e ou da diferenciação celular (LADEN et al., 1984; HENNINGAR et al., 1985; NAKAGAWA et al., 1986). As diferentes populações de células em placentas de camundongos foram

identificadas e descritas utilizando apenas parâmetros morfológicos, sem qualquer menção a marcadores celulares específicos (CHATTERJEE-HASROUNI e LALA, 1982; ROSSANT e CROY, 1985).

Em estudos recentes, PEEL e BULMER (1996) utilizaram lectinas como possíveis marcadores celulares seletivos para detectar as diferentes populações de células existentes no ambiente uterino de ratas grávidas. Entre outras células, estes autores constataram que as CGMs apresentaram intensa reação com as lectinas *Triticum vulgare* (WGA), *Maclura pomifera* (MPA) e *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L), fraca com *Canavalia ensiformis* (Con A), *Lens culinaris* (LcH), *Pisum sativum* (PSA) e *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) e negativa com a lectina *Dolichos biflorus* (DBA).

Por outro lado, DAMJANOV e DAMJANOV (1992), constataram que as CGMs eram as únicas células presentes no endométrio gravídico de camundongos e ratos, que reagiam com a lectina *Dolichos biflorus* (DBA) fluoresceïnada. Segundo estes autores, a lectina DBA seria bastante específica para marcar as CGMs e a esterase presente nessas células é que estaria reagindo com esta lectina.

Assim sendo, a histoquímica de lectinas constitui-se em um método seletivo para identificação das CGMs. No caso da lectina DBA, MOURA e YAMADA (dados não publicados) utilizando a histoquímica de lectinas para identificação de células em úteros de camundongos prenhes, também constataram células lectina DBA positivas na região do triângulo mesometrial. Porém, para caracterizar a lectina DBA como possível marcador seletivo, faz-se necessário o estudo citoquímico ultra-estrutural para estabelecer precisamente a localização dos glicoconjugados em cada compartimento subcelular.

#### **1.4. Proteinases lisossômicas**

As proteinases lisossômicas em geral são glicoproteínas, cujos oligossacarídeos estão ligados à asparagina. À semelhança de outras enzimas compartimentalizadas nos lisossomos, estas moléculas são modificadas durante o transporte através do retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi, revelando resíduos de manose fosforilados. Receptores de fosfomanosil reconhecem estes resíduos e o complexo

receptor-enzima é transportado da região trans-Golgi para os endossomos, onde o complexo é dissociado (TAKAHASHI et al., 1982; KOMINAMI et al., 1988; UCHIYAMA et al., 1994).

YOKOTA et al. (1990), utilizando fígado e rim de ratos, observaram as proteinases lisossômicas (catepsinas B, H, L e D) presentes nas pequenas vesículas oriundas do retículo endoplasmático e vesículas revestidas de clatrina provenientes do complexo de Golgi.

As proteinases são sintetizadas como grandes precursores inativos (ROWAN et al., 1992; HASILIK, 1992), cuja ativação ocorre pela clivagem proteolítica da forma precursora (HASILIK, 1992). Esta clivagem se dá através de uma autocatálise (HASILIK et al., 1982; SALMINEN e GOTTESMAN, 1990) ou pela ação de outras proteinases (ROWAN et al., 1992).

As catepsinas B, H e L são cisteínas proteinases representativas dos lisossomos de células de mamíferos (KATUNUMA e KOMINAMI, 1983; KIRSCHE et al., 1980 e 1982; UCHIYAMA et al., 1994), que acredita-se terem um importante papel no metabolismo protéico das células (KOMINAMI et al., 1988; UCHIYAMA et al., 1994). Essas catepsinas apresentam atividade ótima em pH ácido, mas este pH ótimo pode variar dependendo do substrato e acessibilidade da ligação ao peptídeo (KIRSCHE et al., 1980; UCHIYAMA et al., 1994).

Em algumas células endócrinas, estudos imunocitoquímicos demonstraram que estas enzimas são transferidas da região trans-Golgi, não apenas para os lisossomos, mas também para grânulos secretores. As catepsinas B e H foram localizadas em grânulos secretores de células produtoras do hormônio renina (TAKAHASHI et al., 1982; UCHIYAMA et al., 1994). Particularmente a catepsina B foi co-localizada com este hormônio nos grânulos secretores de todas as células produtoras de renina ativa, sugerindo que a catepsina B seja a provável candidata à ativação desse hormônio (TAKAHASHI et al., 1982; UCHIYAMA et al., 1994). Estes autores sugerem ainda que a expressão das cisteínas proteinases sejam reguladas de acordo com a diferenciação ou especialização celular.

YOKOTA et al. (1986a,b) detectaram, por “immunoblotting”, em extrato lisossômico de rim de rato, a presença de catepsina B com dois pesos moleculares diferentes, 29 kd e 25 kd.

Vários autores sugerem que as cisteínas proteinases, como a catepsina B, devem ser sintetizadas na forma de pró-enzima inativa no retículo endoplasmático granular de vários tecidos, e convertida em enzima ativa no compartimento lisossômico (SEGUNDO et al., 1985; KOMINAMI et al., 1988). Esse processo da conversão intracelular da pró-catepsina B (forma inativa) em catepsina B (enzima ativa) necessita da presença da catepsina D (NISHIMURA et al., 1988). Outros autores (FELLEISEN e KLINKERT, 1990; MACH et al., 1994) concluíram que este processo de ativação da pró-catepsina B seria um evento autocatalítico.

A catepsina D é uma aspartil proteinase, amplamente distribuída em células animais, e com um importante papel no processamento e ativação de outras enzimas proteolíticas, como a pró-catepsina B, nos lisossomos (NISHIMURA et al., 1988).

A aspartil proteinase catepsina D é muito semelhante à outra aspartil proteinase, a catepsina E. Ambas são proteinases, inibidas por pepstatina e requerem um pH ácido para ativação. Apesar de apresentarem sítios ativos semelhantes, estas enzimas são estruturalmente diferentes. Além disso, a catepsina D é uma enzima lisossômica, enquanto a catepsina E é uma aspartil proteinase não lisossômica (SIMON et al., 1994).

DELBRÜCK et al. (1994), trabalhando com frações imuno-isoladas de organelas pré-lisossômicas, sugeriram que a etapa inicial da ação proteolítica e a ativação enzimática da catepsina D, ocorrem nestas organelas. Primeiramente sintetizada como uma pró-enzima, a pró-catepsina D (46 kDa), é então processada para uma forma com 30 kDa e considerada ativa (ERICKSON e BLOBEL, 1979).

Algumas proteinases, como a catepsina D, provavelmente têm seu sítio intracelular de ativação nos endossomos, como foi identificado em macrófagos (DIMENT et al., 1988) e células hepáticas (RIJNBOUTT et al., 1991). A catepsina D em macrófagos e células hepáticas parece ser inicialmente sintetizada como um precursor associado à membrana, que se converte após a quebra proteolítica para a forma solúvel encontrada nos lisossomos (DIMENT et al., 1988; RIJNBOUTT et al., 1991).

A catepsina D é capaz de degradar tanto proteínas estruturais quanto funcionais, tais como hemoglobina (IKEDA et al., 1989), soro albumina (IKEDA et al., 1989) e colágeno (HELSETH e VEIS, 1984).

Além disso, a catepsina D tem sido associada a tumores e metástases de mama (SPYRATOS et al., 1989; TANDON et al., 1990) e ovário (SCAMBIA et al., 1994), carcinomas e melanomas (LETO et al., 1992), sendo considerada a proteinase possivelmente secretada por estas células cancerígenas capaz de degradar matriz extracelular em pH ácido.

Os grânulos das CGMs à semelhança dos grânulos das NK devem sofrer um fenômeno de degranulação e os seus componentes devem atuar predominantemente no meio extracelular. Desta forma, é possível que enzimas da categoria da catepsina B possam coexistir nos grânulos das CGMs, desempenhando um importante papel na ativação ou maturação de outros constituintes intragranulares. Da mesma forma, a enzima catepsina D também poderia ser um constituinte dos grânulos das CGMs, tendo uma ação sinérgica junto com outras substâncias líticas na degradação das células alvo.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivos:

- Estabelecer o padrão morfológico e a distribuição das Células Granulosas Metriais (CGMs) presentes no ambiente uterino, durante os períodos de pré-placentação e placentação em camundongos.
- Estabelecer um marcador seletivo, através da histoquímica e citoquímica de lectinas, para identificar e localizar as Células Granulosas Metriais no ambiente uterino.
- Determinar, através da imunocitoquímica, a presença das enzimas catepsinas D e B nos grânulos das Células Granulosas Metriais e caracterizar uma possível subcompartimentalização lisossômica destes grânulos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem Swiss, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com idade entre 12 e 16 semanas, foram acasalados e foi considerado o primeiro (1º) dia de gestação (ddg) aquele em que foi constatada a rolha vaginal.

Quarenta e cinco animais foram divididos e sacrificados no 9º, 11º, 13º, 15º e 17º dias de gestação (ddg). Em cada um dos dias de gestação estabelecidos, utilizamos três grupos de três animais destinados respectivamente para inclusão em parafina, em resina epóxi e em resina LR-White.

Cada um dos animais, após inalação de éter etílico, foi laparatomizado e sendo confirmada a presença de sítios de implantação ou fetos em desenvolvimento, foi acessada a cavidade torácica. Os animais foram perfundidos, via ventrículo esquerdo, com 30ml de solução fixadora por um período de 15 minutos. A drenagem da solução foi obtida pela secção da aurícula direita.

Para o processamento de cada grupo foram utilizadas três soluções fixadoras distintas, conforme descrição a seguir. Nos materiais destinados à inclusão em parafina (grupo 1), a solução fixadora utilizada era constituída de paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) em tampão fosfato de sódio-salina 0,1M, pH 7,4. Já os materiais destinados à inclusão em resina epóxi (grupo 2), a fixação foi realizada por paraformaldeído 2%, glutaraldeído 1,5% (Ladd Research, Burlington/USA) e sacarose 0,1M em tampão fosfato de sódio-salina 0,1M, pH 7,4. Os materiais destinados à inclusão em resina LR-White (grupo 3) foram fixados por paraformaldeído 4% , glutaraldeído 0,2% e sacarose 0,1M em tampão fosfato de sódio-salina 0,1M, pH 7,4.

Fragmentos de baço também foram coletados simultaneamente para os grupos 1, 2 e 3, destinados ao controle das reações citoquímicas e imunocitoquímicas.

### 3.2. Processamento em parafina (grupo 1)

Após a perfusão, os cornos uterinos foram retirados e seccionados da seguinte maneira: no 9º dia de gestação, cada sítio de implantação foi seccionado sagitalmente

na região mediana; nos 11º, 13º, 15º e 17º dias, os botões placentários foram isolados e seccionados da mesma maneira, obtendo-se, então, duas metades.

Os fragmentos obtidos permaneceram imersos na solução fixadora, durante 4 horas, foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina (Histosec-Merck/ RJ).

Cortes de 5µm de espessura foram coletados em lâminas histológicas pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA). Alguns cortes foram corados em H.E., para análise preliminar quanto ao grau de preservação e planos de orientação. Somente aqueles materiais cujos cortes foram identificados como sendo adequados foram processados para análises citoquímicas e imunocitoquímicas.

### **3.3. Processamento para microscopia eletrônica de transmissão**

#### **3.3.1 - Resina epóxi (grupo 2)**

Os materiais destinados à análise ao microscópio eletrônico foram coletados e processados da seguinte maneira: no 9º ddc, os sítios de implantação foram retirados um a um e seccionados sagitalmente na região mediana, nos dias posteriores, os botões placentários foram retirados, as regiões correspondentes à glândula metrial foram isoladas e seccionadas em pequenas fatias de 2 a 3 mm de espessura.

Os fragmentos obtidos permaneceram imersos na solução fixadora, durante 3 horas, a 4º C. Após este período passaram pelas seguintes etapas:

1. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 30 min a 4º C;
2. pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% (Ladd Research, Burlington/USA) em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 1 h a 4º C;
3. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 30 min a 4º C;
4. desidratação em gradiente crescente de etanol (70, 80, 95 e 100%) durante 30 min cada;
5. embebição em mistura de etanol e óxido de propileno (Aldrich Chemical Co/USA) na proporção 1:1 durante 30 minutos, óxido de propileno puro durante 30 minutos e

mistura de óxido de propileno e resina Epon 812 (Polysciences/Warrington) na proporção 1:1 durante 1 hora;

6. embebição em resina pura durante 12 horas;
7. inclusão e polimerização a 60° C durante 48 h.

Cortes semifinos de aproximadamente 0,5 µm foram obtidos em ultramicrotomo Porter Blum MT2 ( Sorvall ) e corados em solução de Azul de toluidina 0,5% em borato de sódio, com a finalidade de definir a área de interesse.

Os cortes ultrafinos de coloração cinza-prateado, foram obtidos no mesmo ultramicrotomo, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila (Riedel-de Haen, Hannover/República Federal da Alemanha) a 2%, durante 20 minutos e citrato de chumbo (Ecibra/SP) a 0,5%, durante 5 minutos. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 9S, Philips EM 400 e Jeol 100 CX II.

### **3.3.2 - Resina LR-White (grupo 3)**

Os fragmentos destinados a esta técnica foram obtidos da mesma forma descrita para técnica da resina epóxi. Estes fragmentos permaneceram imersos na solução fixadora (grupo 3), durante 1 hora, a 4° C. Após este período passaram pelas seguintes etapas:

1. lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4 , 3 x 15 min a 4°C;
2. lavagem em glicina (Merck/Darmstadt) 0,1M durante 1h a 4°C;
3. lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7.4 ,3 x 15 min a 4°C;
4. desidratação em gradiente crescente de N-N dimetilformamida 50, 70, 80, 90 e 100% (Merck/RJ) durante 30 min cada, a 4°C;
5. embebição em mistura de N-N dimetilformamida e resina LR-White (Medium Grade-Ladd Research, Burlington/USA) nas proporções de 1:1 e 1:2 durante 1 h cada, e resina pura a -20°C;
6. embebição em resina pura durante 12 h a -20° C;
7. inclusão em cápsulas “beem” de fundo chato e polimerização induzida com luz ultravioleta (15 Watts) a -20° C por 48 h.

Cortes semifinos de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  foram obtidos em ultramicrotomo Porter Blum MT2 (Sorvall) e corados em solução de Azul de toluidina 0,5%.

Uma vez definida a área de interesse, cortes ultrafinos de coloração dourada foram obtidos no mesmo ultramicrotomo e coletados em telas de níquel.

### **3.4. Reações histoquímicas**

#### **3.4.1. PAS**

Cortes de parafina de cada um dos dias de gestação foram desparafinizados, hidratados e submetidos à técnica de PAS, com as seguintes variações:

- **Tratamento prévio com amilase:** 5 ml de amilase (Fungamyl Ultra S, AFVU012/Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda.) em 95 ml de água destilada, durante 30 min, a 37° C.

- **Tratamento prévio com desoxicolato de sódio:** desoxicolato de sódio (Fisher Scientific Co/New Jersey) a 2%, em água destilada, durante 2 horas, a 47° C.

Após o tratamento, foram processados conforme as etapas a seguir:

1. lavagem em água destilada;
2. oxidação com ácido periódico (Merck/Darmstadt) 0,5% durante 10 min;
3. lavagem em água destilada durante 5 min;
4. reativo de Schiff durante 9 min no escuro;
5. lavagem rápida em água destilada;
6. lavagem em bissulfito de sódio 0,5% ( Reagen/RJ ) durante 9 min.

Os cortes foram, então, lavados em água destilada, contracorados com hematoxilina de Harris (Merck/Darmstadt) durante um minuto e processados para montagem permanente com bálsamo sintético-Entellan (Merck/Darmstadt).

### 3.4.2. Lectina DBA

Para a histoquímica de lectinas, foi utilizada a lectina *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada com biotina (Wako Chemical Co/Japão).

Cortes de parafina de cada um dos dias de gestação, foram desparafinizados e submetidos à histoquímica de lectinas, passando pelas seguintes etapas:

1. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 15 min;
2. tratamento com tampão fosfato-salina 0,02M, pH 7,4 contendo peróxido de hidrogênio a 0,3 % (Merck), durante 30 min, à temperatura ambiente;
3. lavagem em tampão fosfato-salina 0,02M, pH 7,4 durante 15 min;
4. tratamento com tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M, pH 7,4 contendo 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA - Sigma Tipo V, St. Louis/USA), durante 30 min, à temperatura ambiente;
5. incubação com a lectina DBA, diluída em PBS/BSA 1% na proporção 1:100, durante 12 horas, em câmara úmida, a 4°C;
6. lavagem em tampão fosfato-salina 0,02M, pH 7,4;
7. incubação com o conjugado Avidina-Peroxidase (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) diluído em PBS/BSA 1% na proporção 1:1000, durante 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente;
8. lavagem em tampão fosfato-salina 0,02M, pH 7,4;
9. lavagem em tampão tris fosfato-salina 0,02M, pH 7,4;
10. revelação com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) em tampão tris fosfato-salina 0,02M, pH 7,4 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (Merck);
11. coloração com hematoxilina de Harris (Merck/Darmstadt) durante 1 min e montagem permanente com bálsamo sintético-Entellan (Merck/Darmstadt).

O controle para especificidade da lectina DBA foi obtido adicionando-se seu açúcar inibidor (N-Acetil Galactosamina 0,1 M) durante a incubação da mesma e, para o conjugado avidina-peroxidase, excluindo-se a lectina durante a incubação.

### **3.5. Reação citoquímica da lectina DBA**

Cortes ultrafinos de LR-White coletados em telas de níquel foram submetidos à citoquímica de lectinas, conforme as etapas a seguir:

1. tratamento com TBS/BSA 1%, pH 6,8, durante 1 h à temperatura ambiente;
2. incubação com a lectina DBA, diluída em TBS/BSA 1%, pH 6,8, na proporção 1:100, 12 horas em câmara úmida, a 4° C;
3. lavagem com TBS 0,02 M, pH 7,4;
4. incubação com streptoavidina-ouro de (5 nm), diluída em TBS/BSA 1%, pH 7,4, na proporção de 1:50, durante 45 min, à temperatura ambiente;
5. lavagem em água Milli-Q.

Os cortes foram contrastados com acetato de uranila (Riedel-de Haen, Hannover/Alemanha) a 2%, durante 5 minutos e citrato de chumbo (Ecibra/SP) a 0,5%, durante 30 segundos e revestidos por uma fina camada de carbono.

As observações foram realizadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 9S, Philips EM 400 ou Jeol 100 CX II.

### **3.6. Reação imunoistoquímica**

Na reação imunoistoquímica para as enzimas catepsina D e B, cortes de parafina de cada um dos dias de gestação foram desparafinizados, hidratados e processados conforme as etapas a seguir:

1. incubação em tampão citrato (Synth/SP) 0,01 M pH 6,0, em forno de microondas (PANASONIC-NN7809BH), em potência máxima, durante 5 min;
2. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 5 min;
3. tratamento com tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 contendo peróxido de hidrogênio a 0,3 % (Merck) durante 30 min, à temperatura ambiente;
4. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 durante 5 min;
5. tratamento com PBS/BSA 1% durante 30 min, à temperatura ambiente;
6. incubação com anticorpo primário anticatapsina D (\*) ou anticatapsina B (\*) diluído em PBS/BSA 1%, na proporção 1:250, durante 12 horas, em câmara úmida, a 4°C;
7. lavagem em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4;
8. lavagem em tampão tris fosfato-salina 0,1M, pH 7,4;
9. incubação com anticorpo secundário, anti-Ig G de coelho obtido em cabra (Nordic Immunology, Tilburg/Netherlands) diluído em PBS/BSA 1%, pH 7,4, na proporção 1:500, durante 45 min, em câmara úmida, à temperatura ambiente;
10. lavagem em tampão tris fosfato-salina 0,1M, pH 7,4;
11. incubação com o conjugado peroxidase-antiperoxidase (R/PAP - Nordic Immunology, Tilburg /Netherlands) diluído em PBS/BSA 1%, pH 7,4, na proporção 1:500, durante 45 min, em câmara úmida, à temperatura ambiente;
12. lavagem em tampão tris fosfato-salina 0,1M, pH 7,4;
13. revelação com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) em tampão tris fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (Merck);
14. contracoloração com hematoxilina de Harris (Merck/Darmstadt) durante 1 min e montagem permanente com bálsamo sintético-Entellan (Merck/Darmstadt).

Os cortes de baço foram processados da mesma maneira e utilizado como controle positivo.

Como controle negativo, foi excluída a etapa de incubação com o anticorpo primário.

---

\* anticorpos primários cedidos pelo Prof. Dr. Sadaki Yokota da Yamanashi School of Medicine, Yamanashi, Japão.

### 3.7. Reação imunocitoquímica

Na reação imunocitoquímica para as enzimas catepsina D e B, cortes ultrafinos de LR-White, coletados em telas de níquel, passaram pelas seguintes etapas:

1. tratamento com PBS/BSA 1%, durante 1 hora, à temperatura ambiente;
2. incubação com o anticorpo primário anticcatepsina D(\*) ou anticcatepsina B (\*), diluído em PBS/BSA 1%, na proporção de 1:500, durante 12 horas, em câmara úmida, a 4°C;
3. lavagem em PBS 0,02M, pH 7,4;
4. incubação com proteína-A ouro (15 nm), diluída em PBS/BSA 1%, pH 7,4, na proporção de 1:50, durante 45 min, à temperatura ambiente;
5. lavagem em água Milli-Q.

No processamento para a anticcatepsina B, o tratamento com PBS/BSA e a incubação com o anticorpo primário foram realizados em pH 8,2. Já para a anticcatepsina D, o pH utilizado foi 7,4.

Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 2%, durante 5 minutos e citrato de chumbo a 0,5%, durante 30 segundos e revestidos por uma fina camada de carbono.

As observações foram realizadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 9S, Philips EM 400 ou Jeol 100 CX II.

---

\* anticorpos primários cedidos pelo Prof. Dr. Sadaki Yokota da Yamanashi School of Medicine, Yamanashi, Japão.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Análise morfológica em microscopia fotônica

Cortes de parafina corados com hematoxilina-eosina e PAS-hematoxilina foram utilizados para o estudo da morfologia das Células Granulosas Metriais (CGMs), nos diferentes dias de gestação.

As CGMs foram identificadas pela sua forma usualmente arredondada ou ovóide, núcleo esférico, geralmente deslocado para periferia da célula, com nucléolo evidente. Foram encontradas algumas células binucleadas e outras em divisão. O citoplasma geralmente apresentou-se pouco corado com conteúdo variável de grânulos intracitoplasmáticos eosinofílicos. Este padrão morfológico foi considerado o mais característico e aqui denominado como sendo o tipo 1 (Fig. 1). Além deste tipo, de acordo com a variação do tamanho e conteúdo de grânulos intracitoplasmáticos, classificamos as CGMs em três outros tipos:

- Tipo 2 - células maiores, repletas de grânulos, porém com citoplasma mais claro devido à extração de seu conteúdo (Fig. 1).
- Tipo 3 - células esféricas, menores que as do tipo 1, com menor número de grânulos e citoplasma basófilo. O seu núcleo apresentava-se esférico, menor que o do tipo 1, porém o padrão de condensação cromatínica era semelhante ao do tipo 1. Notou-se ainda a presença de um halo claro definindo o limite de cada célula, junto às demais células do estroma uterino (Fig. 2).
- Tipo 4 - células pequenas, semelhantes às do tipo 3 quanto ao aspecto do núcleo e basofilia citoplasmática, apresentando também contorno celular definido por um halo, mas destituídas de grânulos intracitoplasmáticos (Fig. 2).

As CGMs dos tipos 1, 2 e 3 apresentaram grânulos intensamente PAS positivos, facilitando a identificação nos preparados histológicos. Positividade difusa também foi observada no citoplasma nas células dos tipos 1, 2 e 3.

Outras células, tais como o espongiotrofoblasto e células decíduais maduras, também mostraram reatividade difusa no citoplasma.

Nos cortes histológicos, que foram tratados previamente com amilase, a reatividade citoplasmática ficou restrita aos grânulos intracitoplasmáticos das CGMs

(Fig. 3). As outras células, antes PAS positivas, também perderam reatividade ao PAS após tratamento com amilase. Já nos materiais tratados com desoxicolato de sódio, quando comparadas aos de PAS, não foram constatadas diferenças significativas de intensidade na reação (Fig. 4), ou mesmo com as demais células endometriais.

Sendo assim, as análises primárias para a identificação, descrição e localização das CGMs no útero foram baseadas nos cortes submetidos à reação de amilase/PAS.

#### **- 9º dia de gestação:**

Neste estágio a região mesometrial apresentava, logo abaixo do miométrio, uma espessa camada de estroma não decidualizado. Após esta camada, observamos células endometriais decidualizadas, entremeadas por vasos sanguíneos dilatados, até às proximidades do embrião (Fig. 5).

Células granulosas dos tipos 1 e 3, PAS positivas, foram encontradas por toda porção decidualizada da região mesometrial, desde as proximidades do embrião, até a porção não decidualizada. Na porção não decidualizada, mais próxima ao miométrio, além de células do tipo 1, foram encontradas também células dos tipos 3 e 4 (Fig. 2). Células do tipo 2 foram encontradas em menor proporção na área próxima ao embrião.

Foram encontradas muitas CGMs em processo de mitose (Fig. 6) e algumas células também na luz dos vasos sanguíneos.

Chamou a atenção a presença freqüente de vasos sanguíneos apresentando endotélio alto (Fig. 2).

O endométrio da região antimesometrial encontrava-se quase que totalmente decidualizado, e apenas uma delgada porção de células não decidualizadas era vista próximo ao miométrio (Fig. 5). Nesta porção, junto às células não decidualizadas, foram encontrados grupos de células com grânulos PAS positivos, amilase resistentes, cuja morfologia não era compatível com qualquer tipo das CGMs. Estas células apresentavam-se globosas, de tamanho irregular, freqüentemente binucleadas, com cromatina pouco condensada e nucléolo pouco evidente, assemelhando-se às células da decídua madura (Fig. 7).

**-11º dia de gestação:**

Concomitantemente ao aumento no volume do útero, verificou-se que na região mesometrial, as células decidualizadas formaram traves espessas entremeadas pelos vasos sanguíneos maternos dilatados. Células trofoblásticas gigantes (CTGs) apareceram dispostas em uma ou mais camadas fazendo a interface materno-fetal com as traves de células decíduais. Abaixo delas, voltadas para o feto em desenvolvimento, foram vistas células trofoblásticas indiferenciadas da placenta fetal em formação.

As CGMs apresentaram-se distribuídas pela porção decidualizada e não decidualizada do endométrio, concentrando-se na porção mediana do botão placentário em formação. Na região não decidualizada, próxima ou junto ao miométrio, foram encontradas células dos tipos 3 e 4. Na transição da região decidualizada para a não decidualizada, foram encontradas predominantemente, células do tipo 1, algumas delas binucleadas. Com frequência estas células estavam presentes na luz dos vasos sanguíneos e outras eram vistas inseridas na parede dos mesmos (Fig. 8). Vasos sanguíneos de endotélio alto estavam presentes nestas regiões (Fig. 8). Entre as células decidualizadas, próximas à interface fetal, foram encontradas CGMs do tipo 2.

Neste estágio, com o crescimento do embrião, verifica-se um substancial adelgaçamento da parede lateral do endométrio na sua porção antimesometrial onde não foram encontradas CGMs. Sendo assim, a partir do 11º ddg, esta porção do endométrio foi removida durante o processamento.

**-13º dia de gestação:**

Neste estágio a placenta já apresentava forma discóide típica e todas as camadas trofoblásticas da porção fetal estavam bem definidas. Na porção mais periférica do endométrio, próxima ao miométrio, foi observada uma região, que frequentemente rompia durante a preparação do material, caracterizando uma fragilidade tecidual localizada. Nesta região, além das células decíduais, estava presente uma grande quantidade de CGMs do tipo 1.

Neste estágio, embora as CGMs estivessem presentes em todo o endométrio, verificou-se a tendência do acúmulo destas células na área central do botão

placentário. A maioria das CGMs do tipo 1 presentes na região decidualizada, apresentou grânulos individualizados, PAS positivos, mas com intensidade variável de reação. Verificou-se ainda, além de células do tipo 1, uma maior frequência de células do tipo 2, principalmente próximas à interface materno-fetal (Fig. 9). Células do tipo 3 e 4 foram observadas no estroma não decidualizado, próximo ao miométrio e no interior desta camada.

As imagens de CGMs do tipo 1 presentes na luz dos vasos, e/ou inseridas nas paredes dos mesmos, tornaram-se mais freqüentes. Os vasos sanguíneos de endotélio alto ainda foram observados.

A partir desse estágio, vasos sanguíneos dilatados artefactualmente foram encontrados na porção materna da placenta, próximo ao miométrio, devido a pressão necessária exercida durante a perfusão da solução fixadora.

#### **-15º dia de gestação:**

Neste estágio, o endométrio apresentava-se menos espesso, e foi freqüente o rompimento da região próxima ao miométrio, já descrita no estágio anterior. A placenta fetal, bastante desenvolvida, apresentava a camada labiríntica mais espessa. As células do espongiotrofoblasto, assim como as CTGs na interface com o tecido materno, mostraram-se bem mais definidas.

O acúmulo de CGMs dos tipos 1 e 2 na porção central era evidente, com aparente aumento no número das células do tipo 2 (Fig. 10). Foram esporádicas as células presentes nas bordas do botão placentário (Fig. 11). Um número reduzido de CGMs do tipo 3 foi encontrado na região junto ao miométrio, onde algumas células apareceram bem próximas ou inseridas nas paredes dos vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos de endotélio alto ainda eram observados, e ocasionalmente CGMs foram encontradas em sua luz (Fig. 10). Células do tipo 4 foram observadas no miométrio, mas não mais no endométrio.

## **-17º dia de gestação:**

Neste estágio a placenta já é considerada totalmente madura. A porção materna estava bastante reduzida, constituída principalmente por um grande número de CGMs dos tipos 1 e 2, acumuladas na porção central do botão placentário, bem próximo ao miométrio. Muitas CGMs foram observadas em contato com as paredes dos vasos de endotélio alto desta região. Algumas estavam protuberantes na luz dos vasos ou ainda no interior destes. Uma ou outra CGM foram encontradas nas bordas laterais do botão placentário.

Células do tipo 3 e 4 praticamente não foram observadas.

A região de rompimento descrita nos estágios anteriores era freqüente e a preservação da integridade deste tecido, neste estágio, era bastante difícil.

## **4.2. Análise ultra-estrutural**

O estudo ultra-estrutural foi focalizado nas CGMs do tipo 1, visando a identificação e caracterização dos grânulos citoplasmáticos como base para a análise das reações citoquímicas e imunocitoquímicas na microscopia eletrônica.

As CGMs apresentaram citoplasma repleto de grânulos e uma grande quantidade de organelas envolvidas por membrana (Figs. 12, 13 e 14). Muitas dessas células apresentaram uma grande quantidade de projeções citoplasmáticas irregulares (Fig. 14).

Chamou-nos a atenção que as organelas envolvidas por membranas, bem como os grânulos encontravam-se sempre concentrados em uma área central da célula próximo ao núcleo (Figs. 12 e 13). A disposição preferencial destas organelas segregava uma área periférica na célula, com menor densidade de organelas, mas ocupada por polissomos livres e grânulos de glicogênio (Figs. 12 e 14).

Numerosas mitocôndrias com projeções tubulares da membrana interna, microvesículas e vesículas revestidas (“coated vesicles”) foram observadas na região do complexo de Golgi, que se apresentou bastante desenvolvido (Fig. 13). Cisternas de

retículo endoplasmático granular de extensões variáveis foram evidentes (Figs. 12, 13 e 14) e ocasionalmente, cisternas mais dilatadas foram vistas próximas aos grânulos.

Em sua grande maioria, os grânulos das CGMs (Figs. 12, 13, 14 e 15) apresentavam forma esférica, porém foram vistos alguns com contorno irregular. Estes grânulos variavam tanto em tamanho quanto em eletrodensidade. A variação na eletrodensidade destes grânulos levava ao estabelecimento de duas áreas bem definidas: uma central maior, de densidade uniforme e periférica, mais eletrodensa. A área periférica ocupava todo o perímetro do grânulo, ou formava um capuz (“cap”) eletrodensamente bem evidente. Esta área mais eletrodensa era ocupada por estruturas membranosas microvesiculares ou tubulares, imersas em uma matriz homogênea (Figs. 13 e 15). Ocasionalmente, foram encontrados nessa região pequenos arranjos cristalinos (Fig. 15).

Nenhuma forma de junção intercelular foi identificada entre as CGMs ou destas com outros tipos celulares.

Além das células aqui classificadas como do tipo 1, também encontramos células cujo citoplasma apresentava menor número de grânulos e células com citoplasma de aspecto extraído, onde na periferia celular havia um predomínio de grânulos de glicogênio. Neste último tipo celular, gotículas de lipídios também foram observadas. Mas em todo material analisado, em nenhum momento foi observada uma célula em processo de degranulação.

### **4.3. Análise histoquímica da lectina DBA**

A reação da lectina DBA foi considerada positiva quando, ao nível da microscopia fotônica, observou-se a presença de uma coloração acastanhada, devido ao precipitado da diaminobenzidina (Figs. 16, 18 e 19) e nos controles correspondentes à ausência deste (Fig. 17).

Em todos os dias analisados, foi detectada reação positiva de diferentes intensidades no interior do citoplasma das CGMs do tipo 1 e 2, freqüentemente delineando os grânulos, e na periferia das CGMs (Figs. 16, 18 e 19). As células dos tipos 3 e 4 (Fig. 18), presentes próximas ao miométrio no 9° e 11° ddd, apresentaram

superfície celular lectina-DBA positiva e os grânulos, quando presentes, também apresentaram-se lectina-DBA positivos.

Das células presentes no endométrio da região mesometrial, apenas as CGMs apresentaram positividade para lectina DBA. No entanto, também mostraram reatividade à lectina DBA, algumas células endoteliais que revestem pequenos vasos encontrados no miométrio e no estroma não decidualizado (Figs. 18 e 19). Esta seletividade na marcação facilitou a identificação e a localização das CGMs no ambiente uterino ao longo dos diferentes dias da gestação. Da mesma forma, a localização e a distribuição das células lectina-DBA positivas coincidiram na sua grande maioria com aquelas observadas pela técnica de PAS (Fig. 19). A exceção foi observada nas células endometriais contendo grânulos PAS positivos encontradas na região antimesometrial no 9º dia de gestação (Fig. 7), as quais não apresentaram marcação pela lectina DBA (Fig. 20).

Nos controles, onde não houve incubação com lectina, ou quando a lectina foi incubada junto com seu açúcar inibidor (N-acetilgalactosamina) constatou-se a ausência da reação (Fig. 17).

#### **4.4. Análise citoquímica da lectina DBA**

A citoquímica da lectina DBA ao nível ultra-estrutural foi revelada com estreptoavidina-ouro (5 nm). As partículas de ouro estavam distribuídas sobre os grânulos das CGMs, tanto na área central homogênea quanto nos “caps” (Figs. 21 e 22). Observou-se variação na intensidade desta marcação entre os grânulos de uma mesma célula.

Além dos grânulos, a membrana plasmática das CGMs também apresentou marcação bem definida (Figs. 22 e 23).

#### **4.5. Análise imunoistoquímica**

A reação imunoistoquímica para as enzimas catepsina B e D foi considerada positiva quando, ao nível da microscopia fotônica, observou-se a presença de depósito acastanhado da diaminobenzidina no interior das células estudadas (Figs. 24, 25 e 26). Nos controles negativos correspondentes, onde não houve incubação com os anticorpos, este precipitado estava ausente.

A reação com o anticorpo anticatapsina D foi detectada no interior das CGMs, tipos 1, 2 e 3, em todos os dias de gestação analisados (Fig. 24 e 25). Maior intensidade de imunomarcção foi observada usualmente na periferia dos grânulos (Fig. 25).

Em todos os dias analisados, as CGMs mostraram reação positiva para anticatapsina B (Fig. 26). O padrão de imunomarcção foi semelhante ao da anticatapsina D, porém sempre com menor intensidade.

Os controles positivos realizados com cortes histológicos de baço demonstraram reação positiva nas células reticulo-endoteliais, tanto para anticatapsina D (Fig. 27), quanto para anticatapsina B, tendo este último sempre apresentado menor intensidade.

#### **4.6. Análise imunocitoquímica**

A imunocitoquímica ao nível ultra-estrutural foi revelada com a técnica da proteína A-ouro (15nm). Para anticatapsina D, as partículas de ouro foram encontradas predominantemente nos “caps” dos grânulos das CGMs (Fig. 28 e 29). A incidência de raras partículas de ouro encontradas nas áreas centrais homogêneas dos grânulos foram comparáveis às da marcação inespecífica (“background”).

Para a anticatapsina B, as partículas de ouro também foram encontradas na região do “cap”, porém esta marcação não foi significativa.

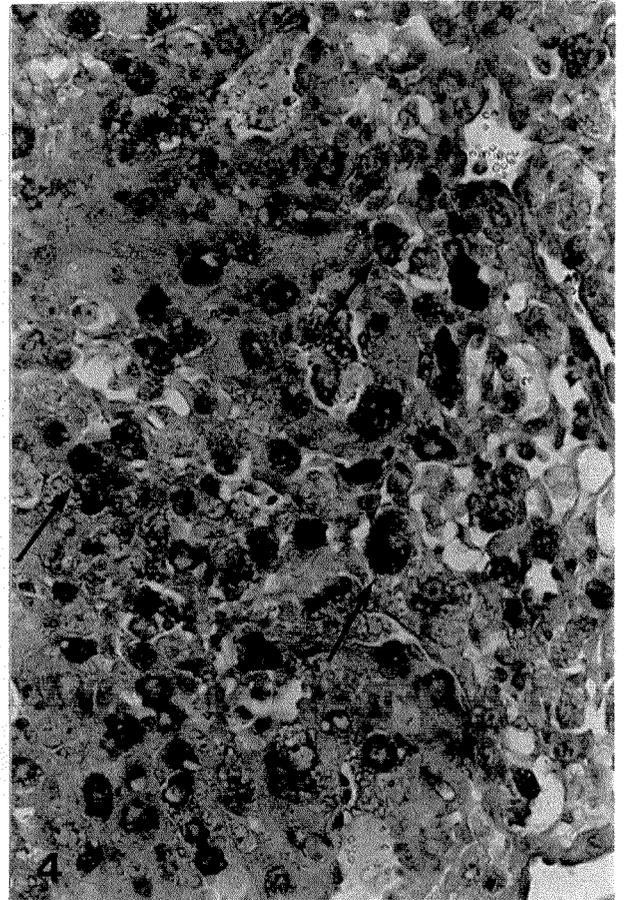
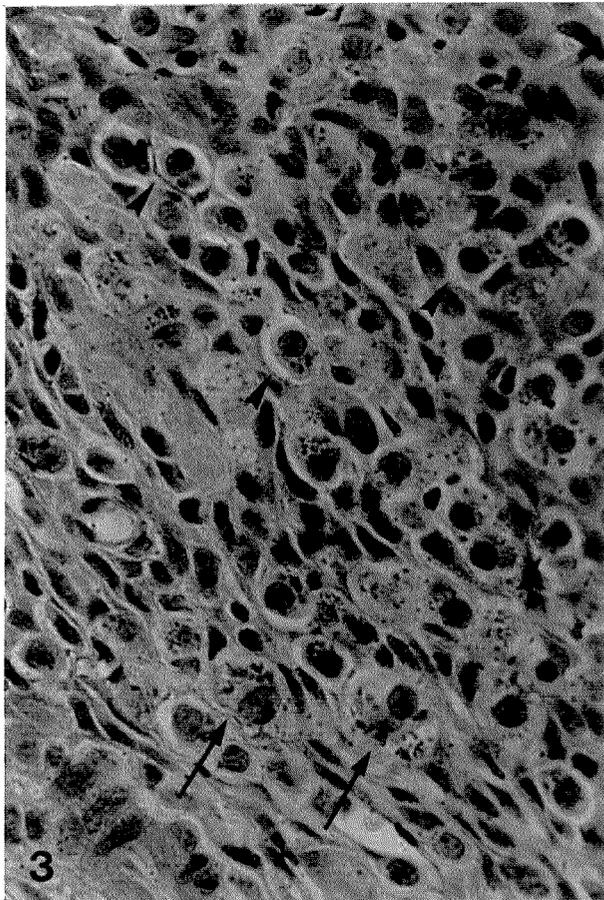
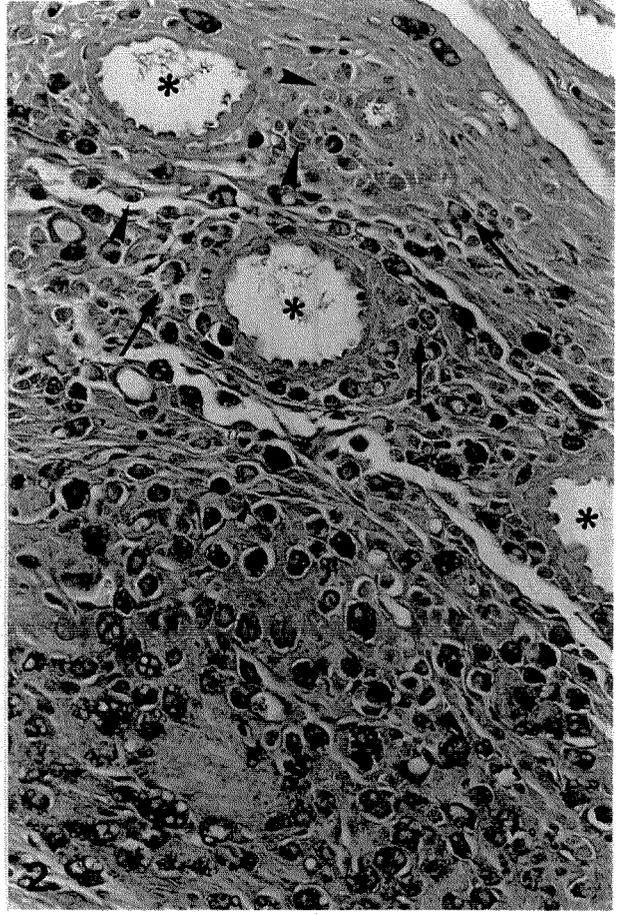
## **5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

**Figura 1** - Fotomicrografia do endométrio decidualizado em área próxima à placenta fetal. Observar típicas CGMs do tipo 1 (setas) com citoplasma repleto de grânulos PAS positivos e CGMs do tipo 2 (cabeças de seta) com o citoplasma de aspecto extraído, do 13º ddg. PAS, hematoxilina, 640x.

**Figura 2** - Fotomicrografia de uma área não decidualizada do endométrio da região mesometrial do sítio de implantação do 9º ddg. Notar na metade superior da foto as CGMs do tipo 3 (setas), pequenas e arredondadas, com um halo claro periférico e menor número de grânulos intracitoplasmáticos PAS positivos e as CGMs do tipo 4 (cabeças de seta), também arredondadas e definidas pelo halo claro, apresentam o citoplasma basófilo, sem grânulos intracitoplasmáticos evidentes. Vasos sanguíneos revestidos de células endoteliais protuberantes (\*). PAS, hematoxilina, 320x..

**Figura 3** - Fotomicrografia da região mesometrial do 11º ddg, mostrando a ação do tratamento prévio da amilase na reação de PAS. Notar a redução de intensidade da reação de PAS no citoplasma das CGMs do tipo 1 (setas) e do tipo 3 (cabeças de setas), e mantida nos grânulos. Notar a presença do halo claro ao redor das CGMs tipo 3. Amilase, PAS, hematoxilina, 640x.

**Figura 4** - Fotomicrografia de 11º ddg, mostrando material previamente tratado com desoxicolato de sódio seguido de reação PAS. Notar CGMs (setas) com grânulos e citoplasma PAS positivos sem alteração significativa da intensidade da reação. Desoxicolato de sódio, PAS, hematoxilina, 320x.



3

4

**Figura 5** - Fotomicrografia de uma vista panorâmica do sítio de implantação do 9º ddg. Embrião (\*), região mesometrial (M), região antimesometrial (AM), camadas do miométrio (cabeças de seta). PAS, hematoxilina, 40x.

**Figura 6** - Detalhe da região mesometrial do sítio de implantação do 9ºddg mostrando a distribuição das CGMs/PAS positivas e amilase resistentes, no endométrio. Cabeças de seta indicam CGMs em figura de mitose. Luz uterina (\*). Amilase, PAS, hematoxilina, 320x.

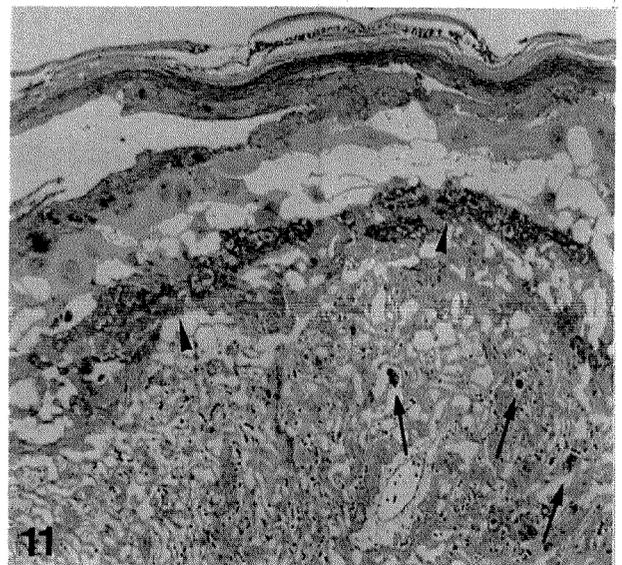
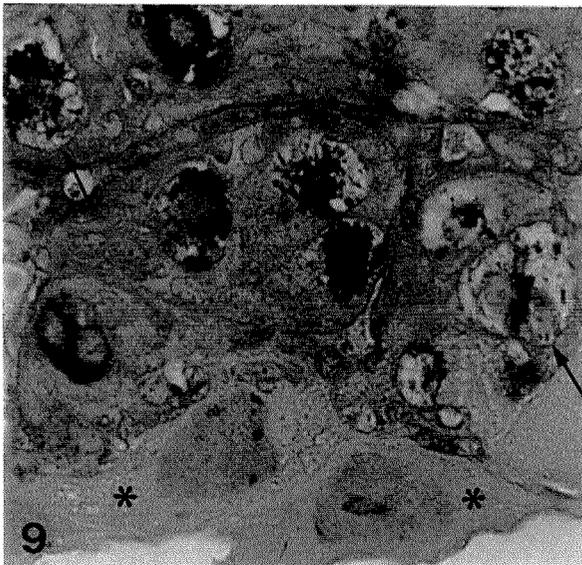
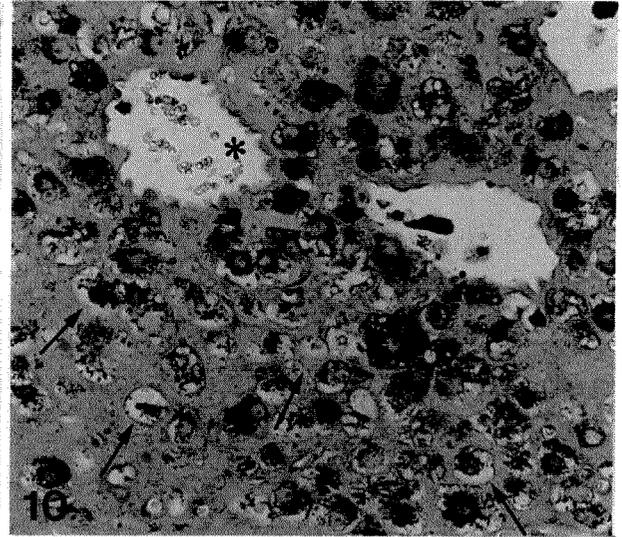
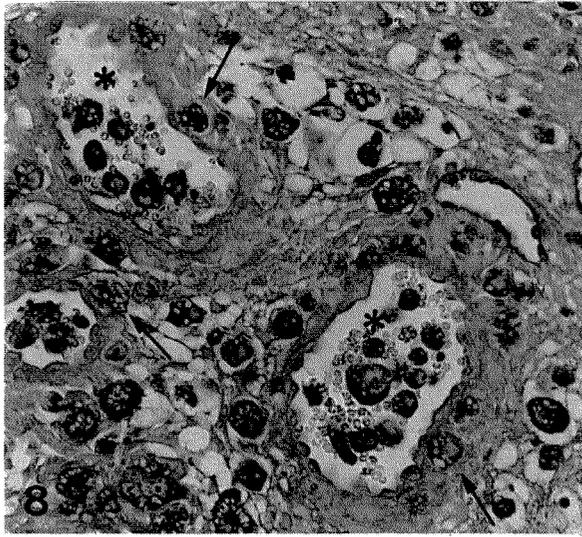
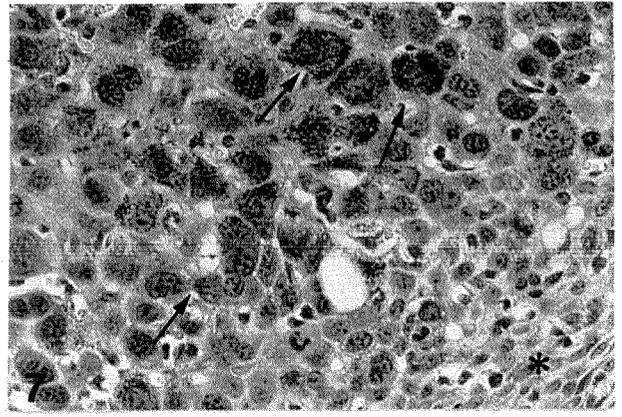
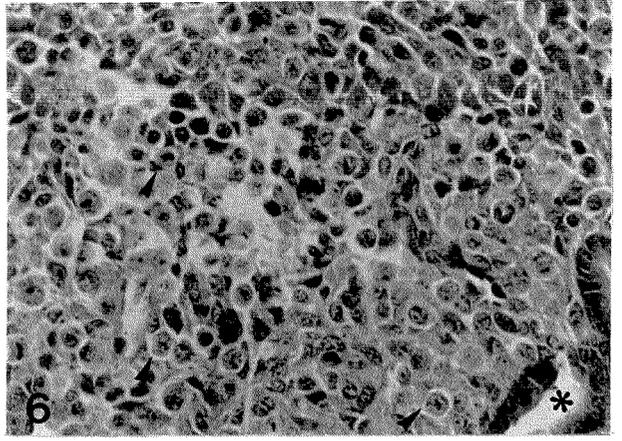
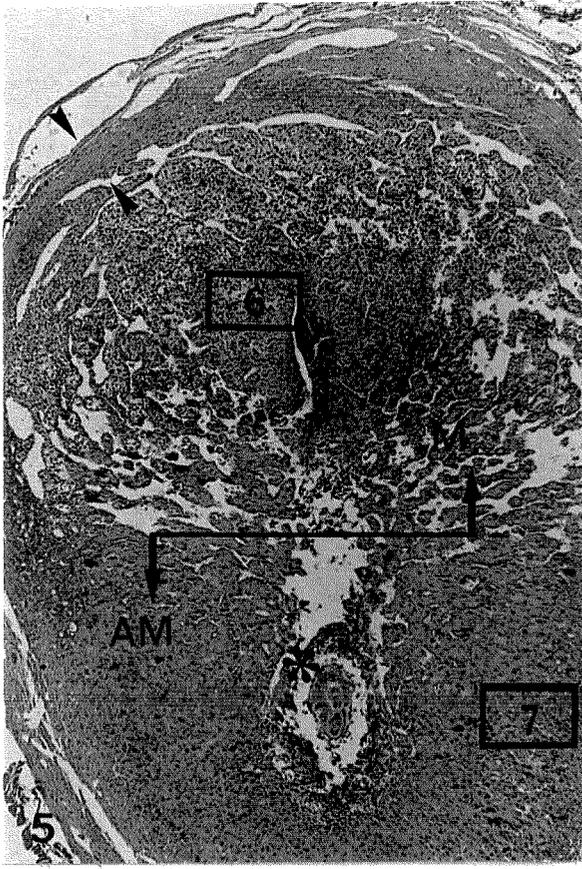
**Figura 7** - Detalhe da região antimesometrial do 9º ddg. Observar células com conteúdo granular citoplasmático PAS positivo e amilase resistentes (setas), junto às demais células decidualizadas. Área do estroma uterino não decidualizada (\*). Amilase, PAS, hematoxilina, 320x.

**Figura 8** - Fotomicrografia da região mesometrial do 11º ddg. Setas indicam CGMs inseridas na parede dos vasos sanguíneos e na luz dos mesmos (\*). Notar o endotélio saliente dos vasos. Canto superior direito mostra porção não decidualizada do endométrio, próxima ao miométrio. PAS, hematoxilina, 320x.

**Figura 9** - Fotomicrografia da região do endométrio próxima à porção fetal da placenta de 13º ddg, mostrando em detalhe CGMs do tipo 2 na interface materno-fetal (setas) e próximas às células trofoblásticas gigantes (\*). PAS, hematoxilina, 640x.

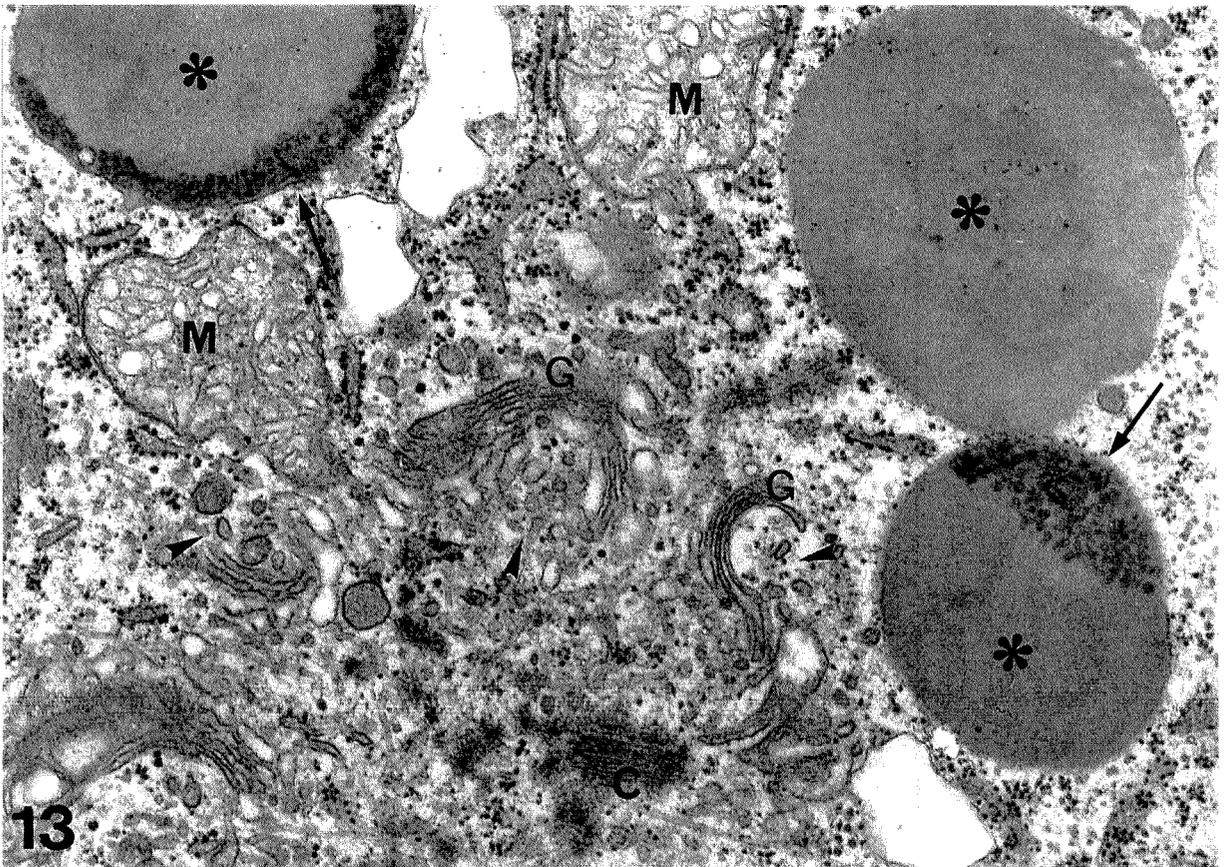
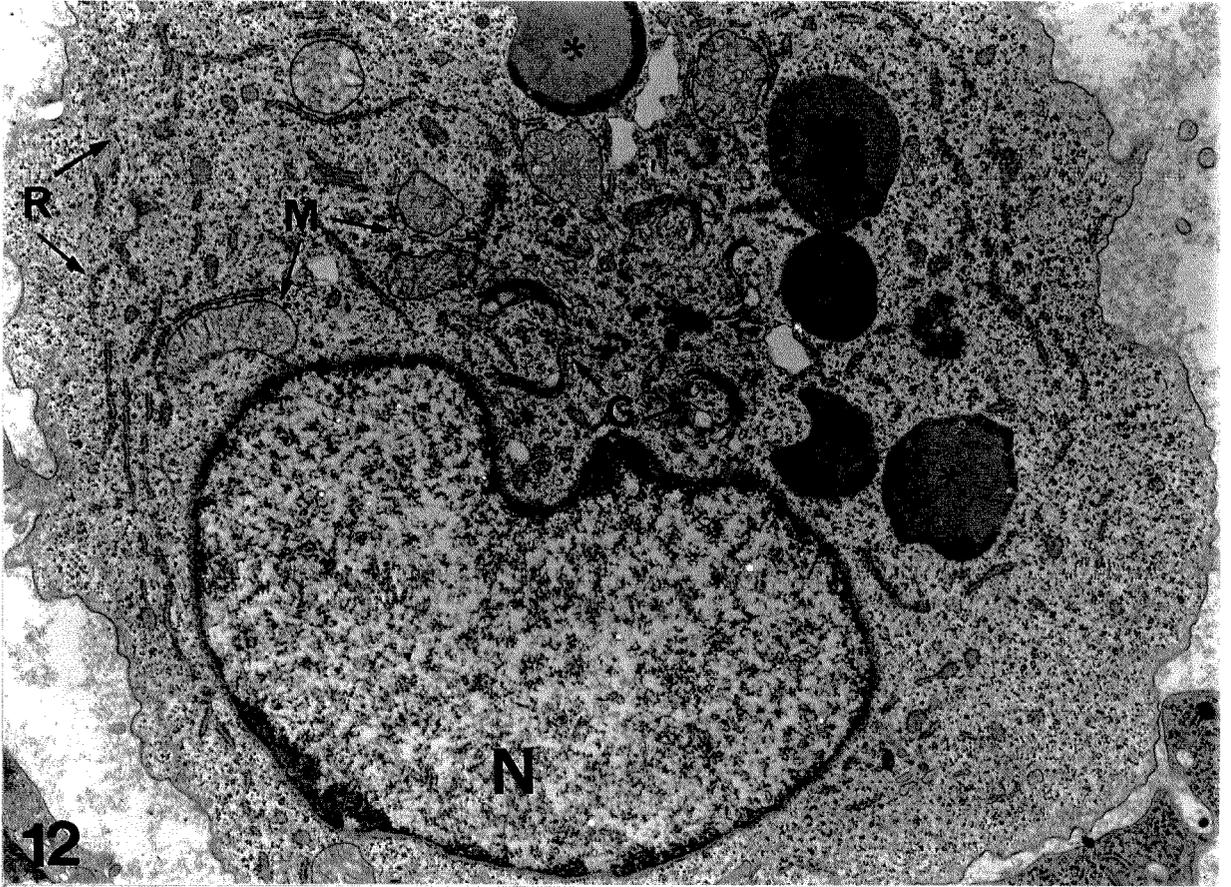
**Figura 10** - Fotomicrografia da placenta de 15º ddg mostrando as CGMs/PAS positivas acumuladas na porção mediana da região mesometrial. Observar o predomínio de CGMs do tipo 2 (setas), apresentando áreas de extração citoplasmáticas. Vasos sanguíneos de endotélio alto (\*). PAS, hematoxilina, 320x.

**Figura 11** - Fotomicrografia da placenta de 15º ddg, mostrando região da borda lateral do botão placentário. As células trofoblásticas gigantes (CTGs) estão acumuladas nesta área, enquanto as CGMs são raras. Observar CGMs (setas) localizadas na camada do labirinto da placenta e as células de glicogênio (PAS positivas) na camada do espongiotrofoblasto (cabeças de seta). PAS, hematoxilina, 160x.



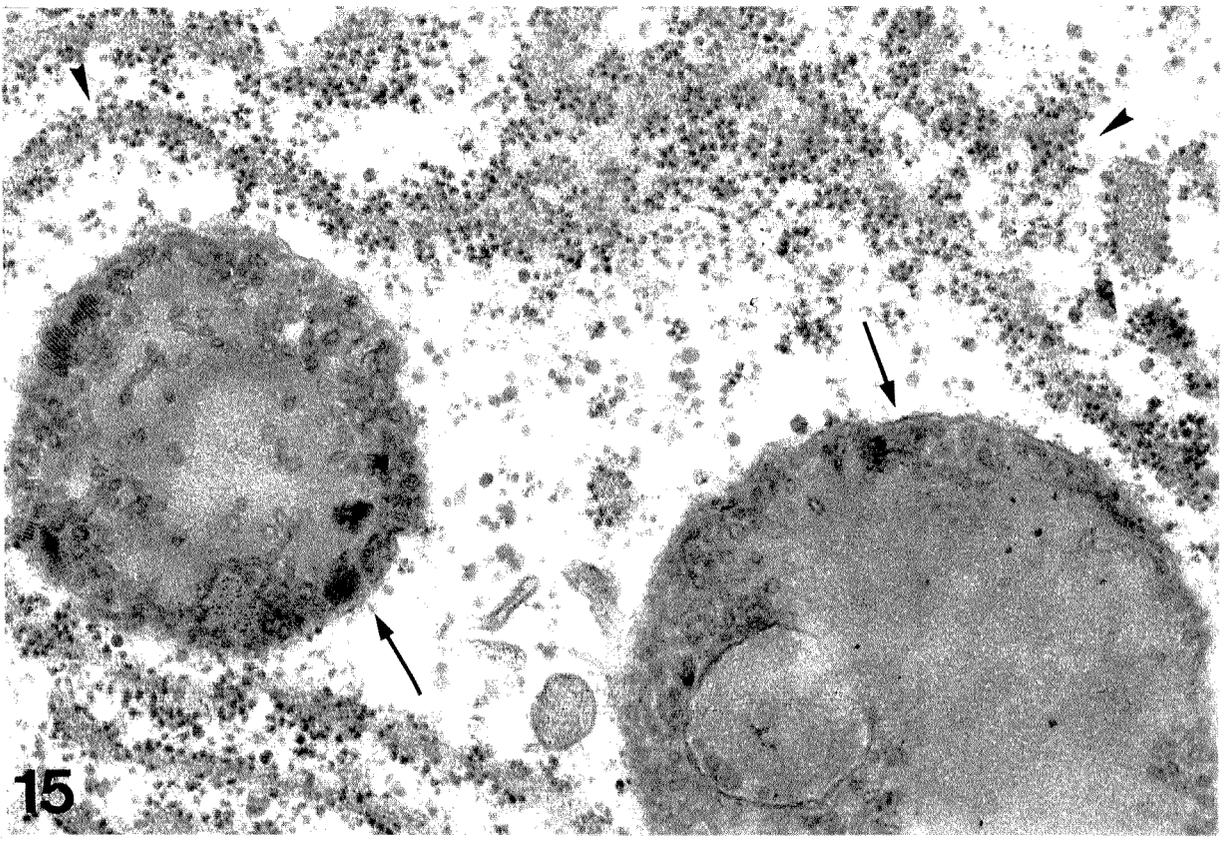
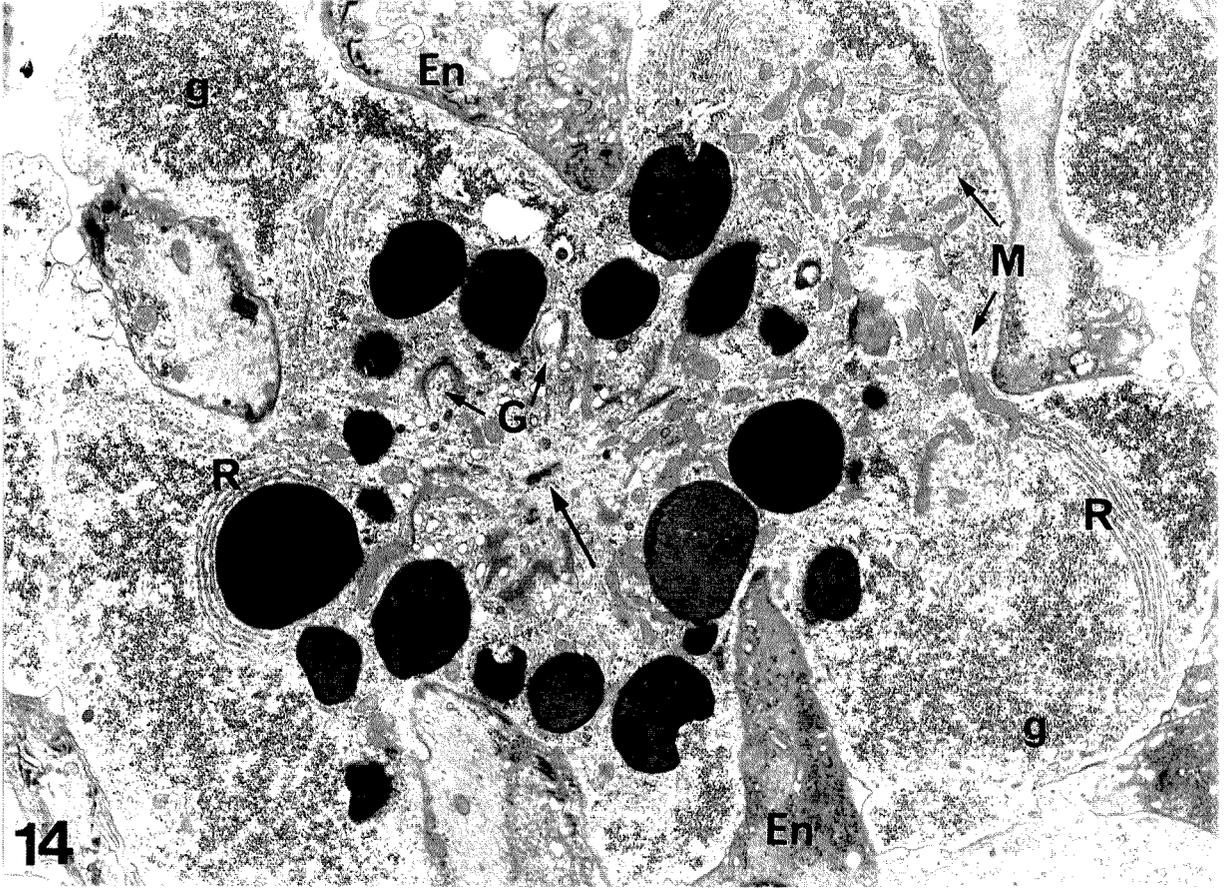
**Figura 12** - Micrografia eletrônica de uma CGM no 9º ddg. Aspecto ultra-estrutural dos grânulos de tamanhos e eletrondensidades diferentes(\*). Notar o núcleo com cromatina pouco condensada (N) e o acúmulo de organelas envolvidos por membrana próximas a este núcleo. Reticulo endoplasmático granular (R), complexo de Golgi (G) e mitocôndrias (M). Eletromicrografia 11950x.

**Figura 13** - Maior aumento da CGM mostrada na eletromicrografia anterior, apresentando área do citoplasma rica em organelas. Observar os grânulos, com o predomínio da área homogênea (\*) e áreas periféricas ocupadas com estruturas mais eletrodensas, constituindo os “caps” (setas). Notar a presença de pequenas vesículas (cabeças de seta) próximas ao complexo de Golgi (G). Mitocôndrias com cristas tubulares (M). Centríolo (C). Eletromicrografia 34950x.



**Figura 14** - Ultra-estrutura de uma CGM no 13º ddg. Observar o acúmulo de organelas envoltos por membrana, tendo ao centro o centríolo (seta). Na região periférica notar as projeções citoplasmáticas espessas, contendo grânulos de glicogênio (g). Notar os grânulos de diferentes tamanhos e eletrodensidades (\*) com “caps” evidentes. Retículo endoplasmático granular (R). Complexo de Golgi (G). Mitocôndrias (M). Projeções citoplasmáticas de células endometriais (En). Eletromicrografia 7500x.

**Figura 15** - Micrografia eletrônica mostrando detalhe dos grânulos com a organização dos “caps” (setas), constituídos de estruturas microvesiculares e tubulares revestidas por membrana. Estruturas em arranjo cristalino são observadas ocasionalmente junto aos “caps” (\*). Cabeças de seta indicam retículo endoplasmático granular. Eletromicrografia 48750x.



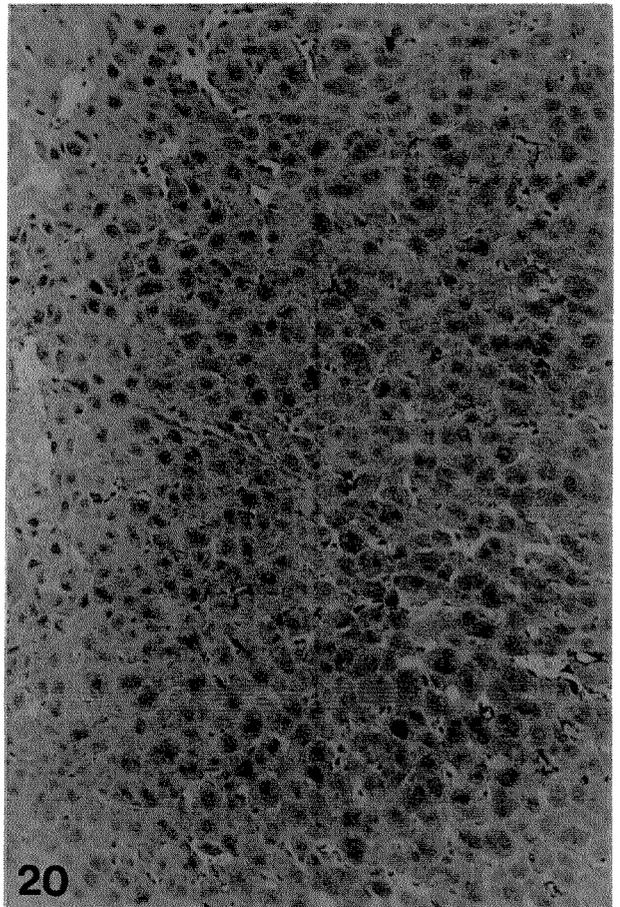
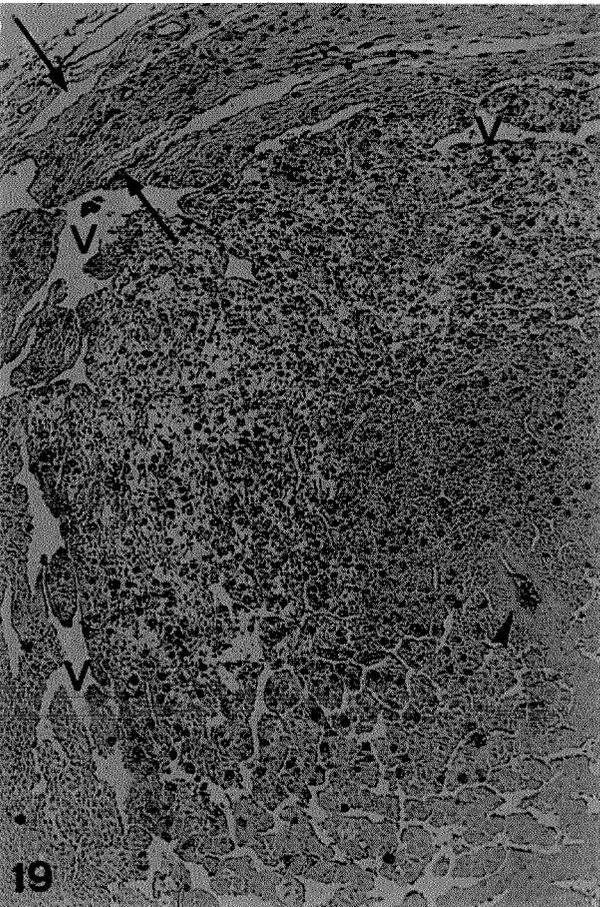
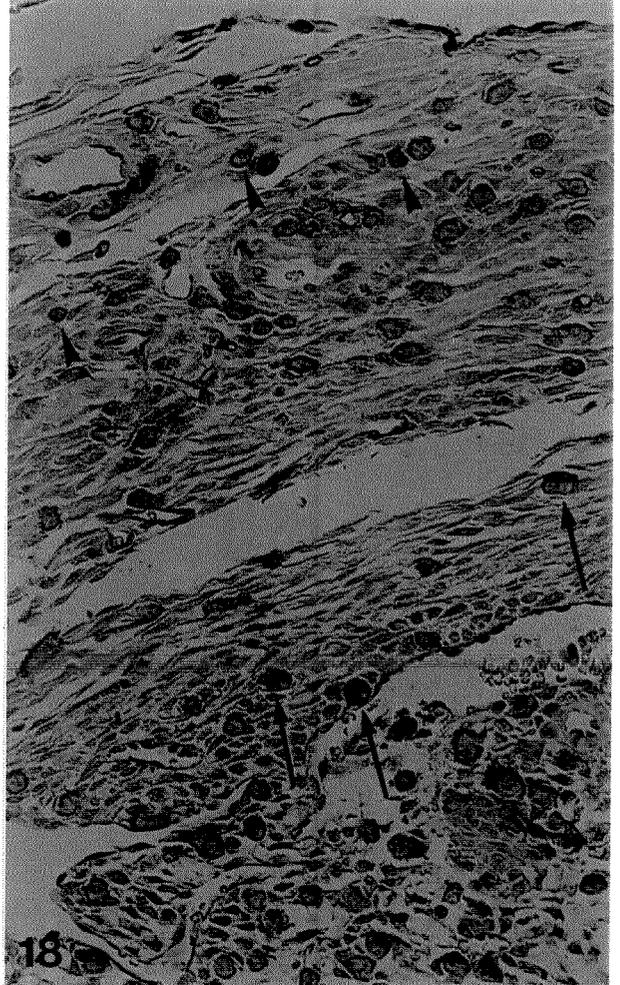
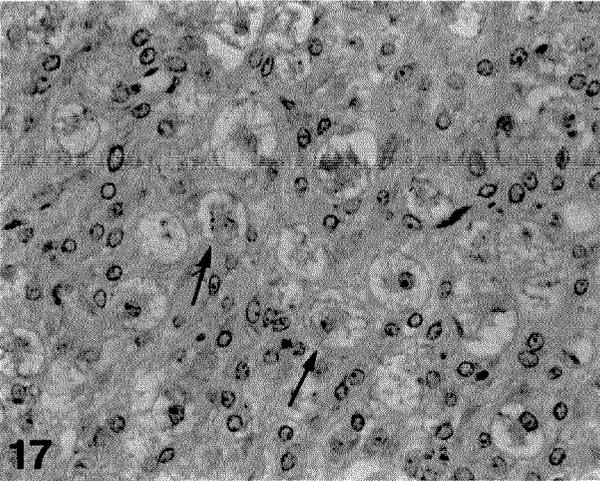
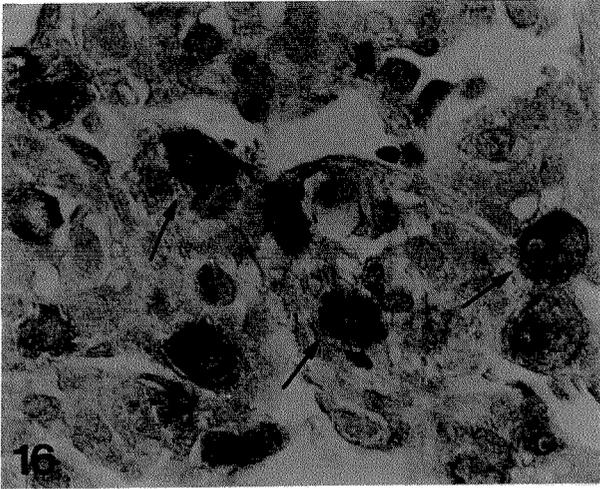
**Figura 16** - Fotomicrografia de placenta no 15º ddg, mostrando o padrão de reatividade da lectina DBA. Notar a deposição da diaminobenzidina no citoplasma, contornando os grânulos e periferia celular das CGMs (setas). Lectina DBA/diaminobenzidina, hematoxilina, 640x.

**Figura 17** - Fotomicrografia de placenta no 15º ddg. Reação controle com incubação da lectina DBA e seu açúcar inibidor. Notar a inibição completa da reação nas CGMs (setas). Lectina DBA/ diaminobenzidina, hematoxilina, 320x.

**Figura 18** - Fotomicrografia da região mesometrial no 9º ddg mostrando a marcação da lectina DBA nas CGMs do tipo 3 (setas) e tipo 4 (cabeças de seta). Notar a reação positiva na superfície das CGMs do tipo 4. Lectina DBA/diaminobenzidina, hematoxilina, 160x.

**Figura 19** - Fotomicrografia da região mesometrial no 9º ddg mostrando que as CGMs lectina-DBA positivas se acumulam nesta região, definindo o triângulo mesometrial. Setas indicam o miométrio. Vasos sanguíneos (V). Luz uterina (cabeça de seta). Lectina DBA/diaminobenzidina, hematoxilina, 80x.

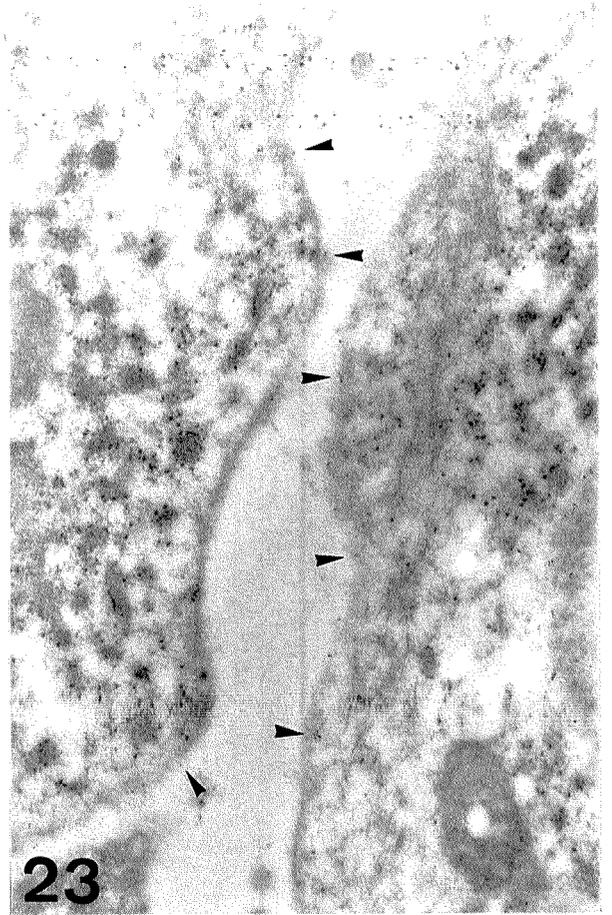
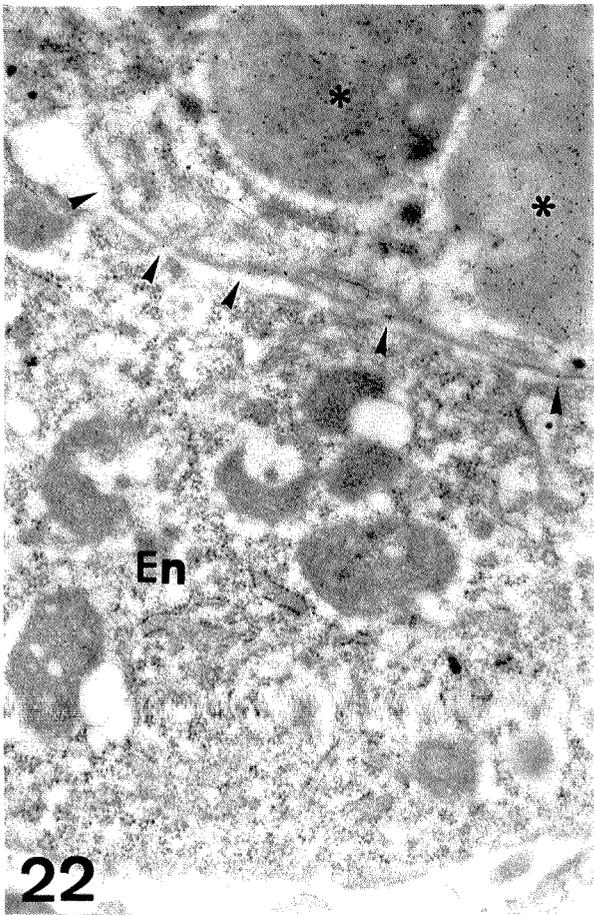
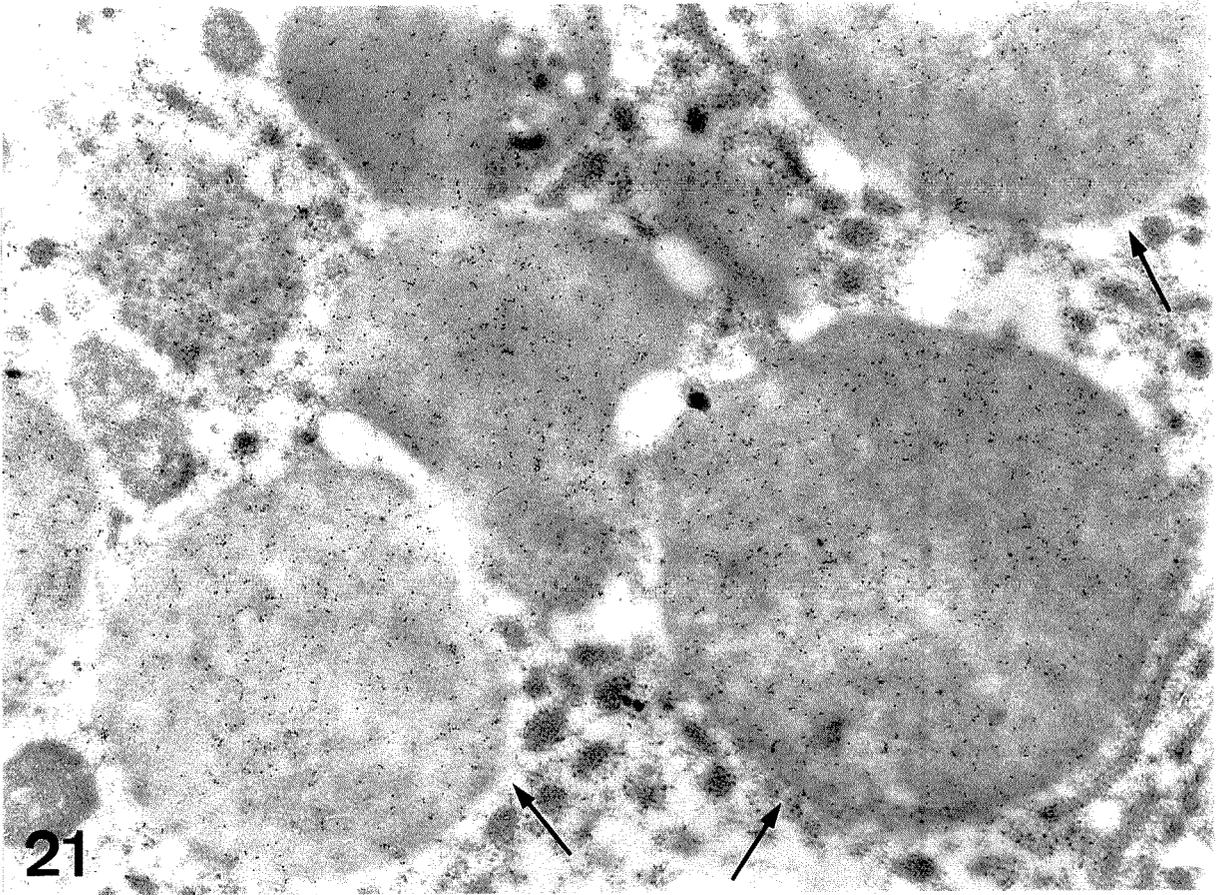
**Figura 20** - Fotomicrografia da região antimesometrial do sítio de implantação no 9º ddg. Notar ausência de reação para lectina-DBA nas células do endométrio decidualizado. Lectina DBA/ diaminobenzidina, hematoxilina, 160x.



**Figura 21** - Citoquímica ultra-estrutural com a lectina DBA, revelada pela estreptoavidina-ouro (5nm). Observar as partículas de ouro distribuídas na matriz e na região do “cap” dos grânulos (setas). Eletromicrografia 37850x.

**Figura 22** - Citoquímica com a lectina DBA. Notar as partículas de ouro nos grânulos das CGMs (\*) e na superfície da célula (cabeças de seta). Observar a ausência de marcação na célula endometrial (En). Eletromicrografia 33100x.

**Figura 23** - Marcação específica da lectina DBA na superfície de duas CGMs (cabeças de seta). Eletromicrografia 35000x.

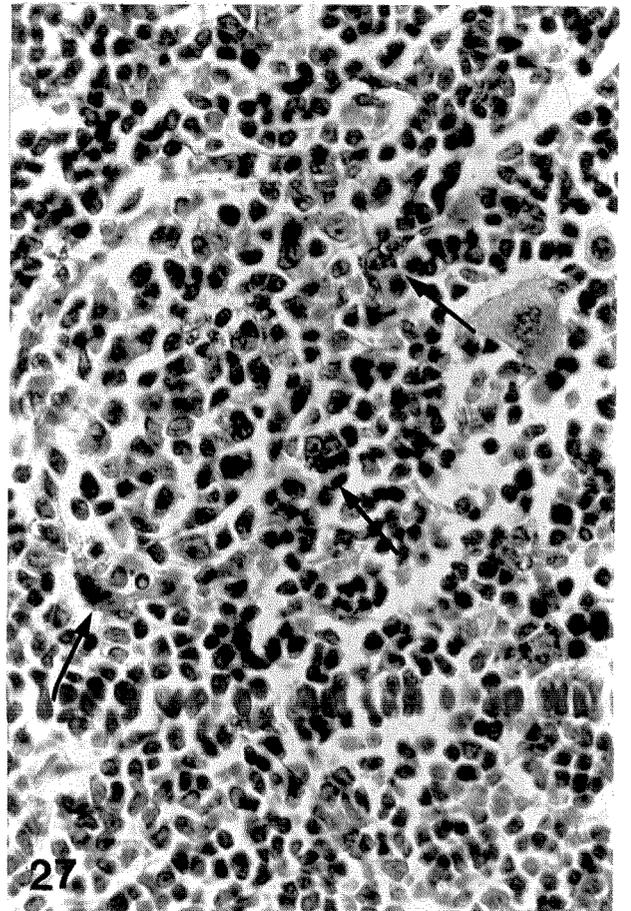
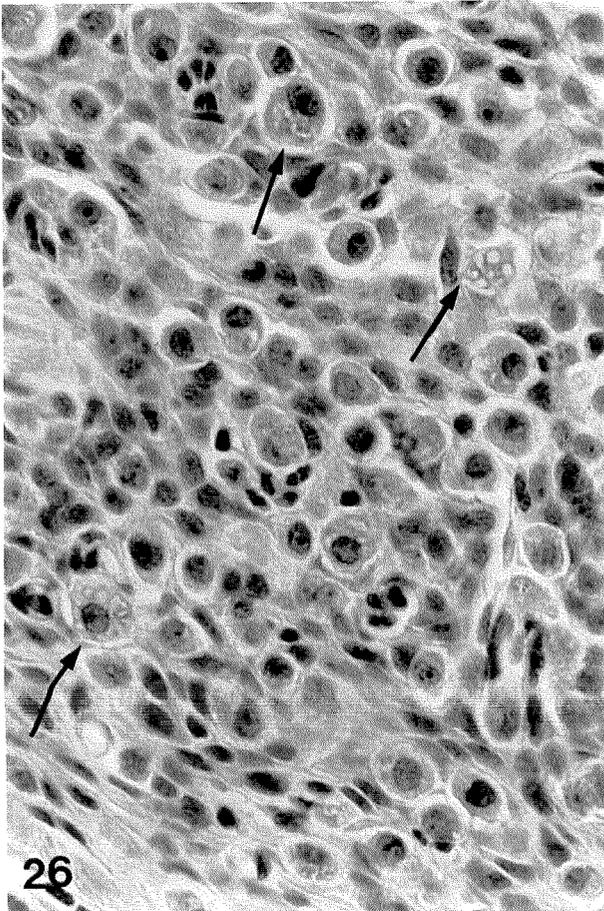
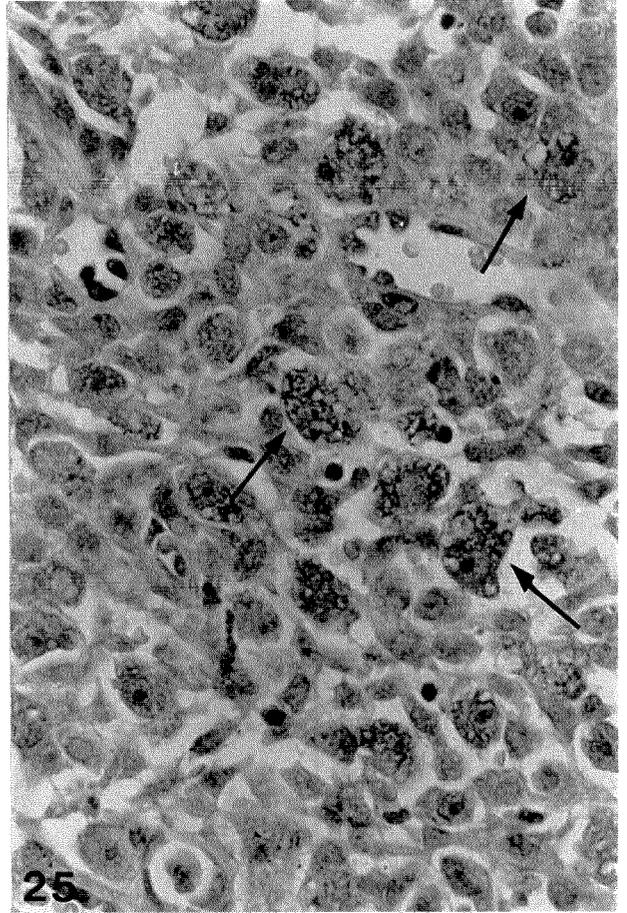
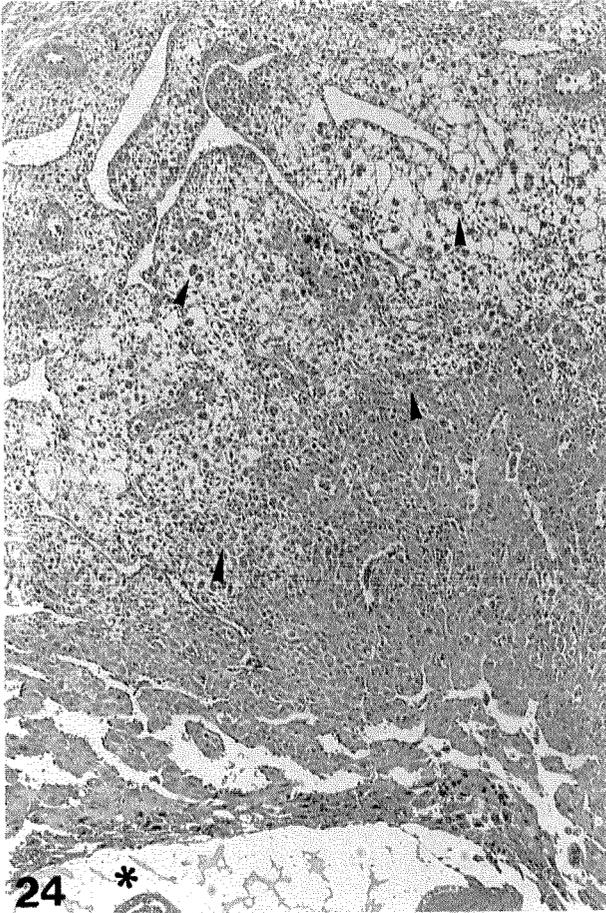


**Figura 24** - Fotomicrografia da região mesometrial no 9º ddg. Reação imunocitoquímica para anti-catepsina D mostrando a distribuição das CGMs catepsinas D positivas (cabeças de seta). Embrião (\*). Imunoperoxidase/diaminobenzidina, hematoxilina, 80x.

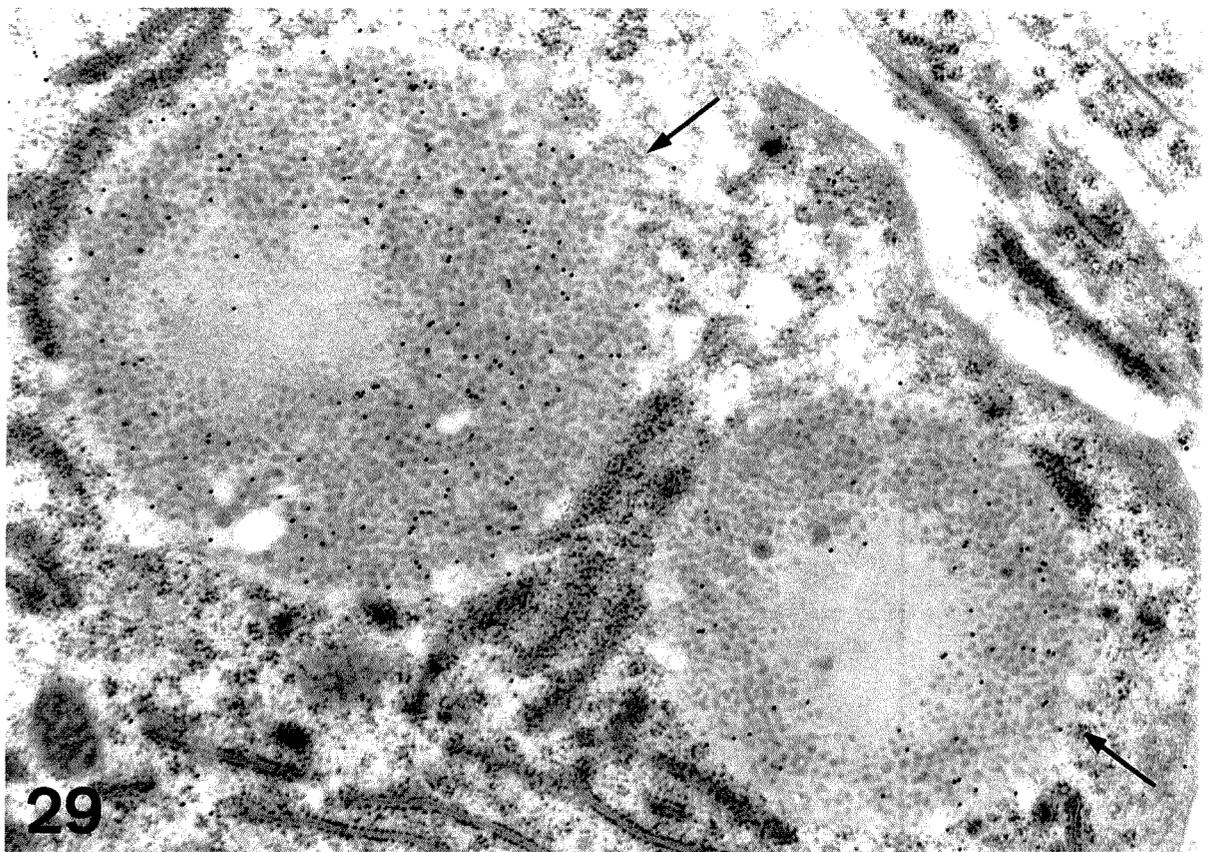
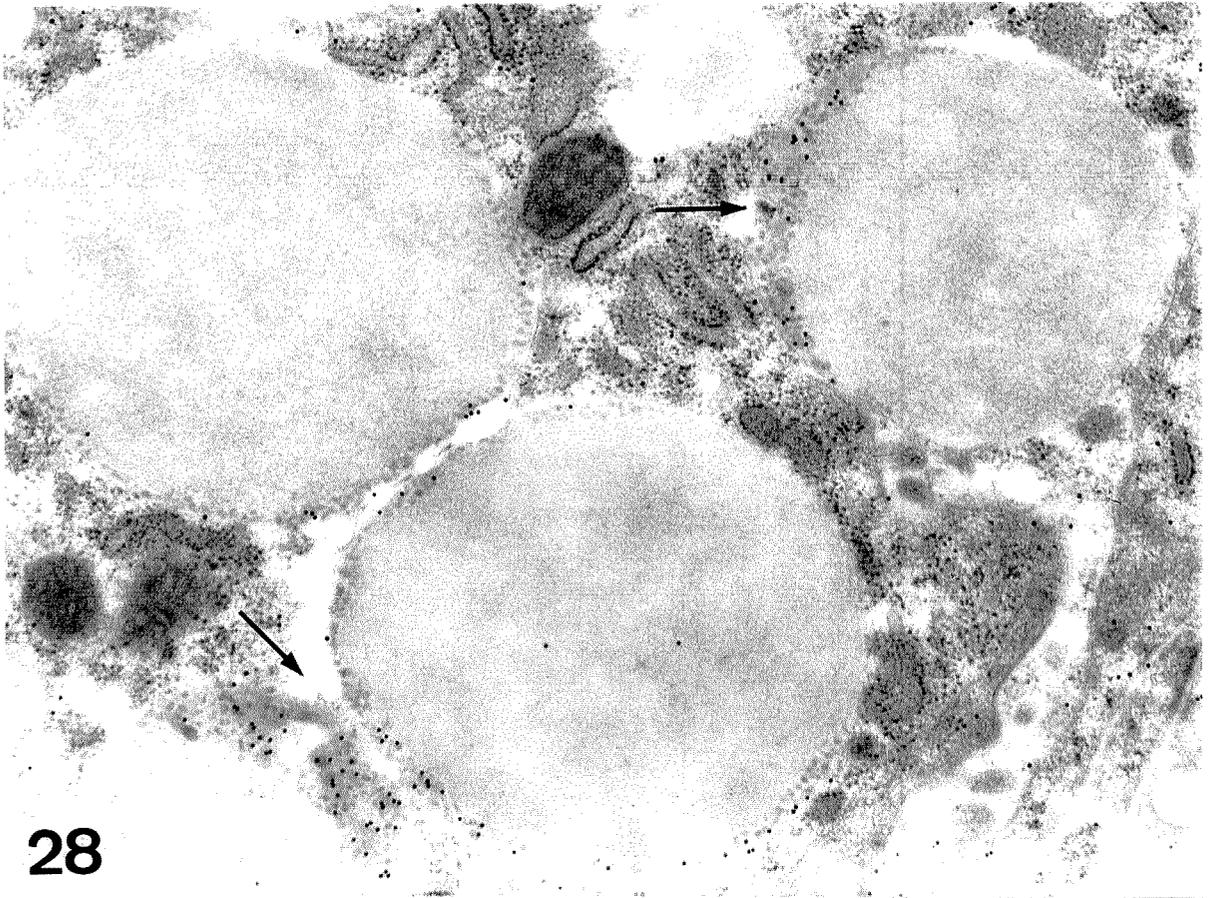
**Figura 25** - Maior aumento da fotomicrografia anterior, mostrando detalhe da positividade nas CGMs. Notar a reação positiva localizada preferencialmente na periferia dos grânulos. Imunoperoxidase/diaminobenzidina, hematoxilina. Fotomicrografia 640x.

**Figura 26** - Reação imunocitoquímica para anticatapsina B. Observar a reação restrita às CGMs (setas) presentes na região mesometrial no 9º ddg. Notar menor intensidade de reação, quando comparada com a anticatapsina D (figura anterior). Imunoperoxidase/diaminobenzidina, hematoxilina. Fotomicrografia 640x.

**Figura 27** - Reação controle para anticatapsina D em baço. A reação positiva é observada nas células retículo-endoteliais (setas). Imunoperoxidase/diaminobenzidina, hematoxilina. Fotomicrografia 640x.



**Figura 28 e 29** - Imunomarcção para anticatapsina D, revelada pela proteína A-ouro (15nm). Observar as partículas de ouro localizadas predominantemente nas áreas ocupadas pelos “caps” dos grânulos das CGMs (setas). Eletromicrografia 37850x.



## **6. DISCUSSÃO**

As Células Granulosas Metriais (CGMs) encontradas em úteros de roedores prenhes, receberam essa denominação devido à sua característica morfológica mais evidente, que é o grande conteúdo de grânulos citoplasmáticos, e a sua distribuição preferencial, na região conhecida como triângulo mesometrial. As CGMs também têm sido denominadas de “NK-like”, devido à sua semelhança fenotípica com células “Natural-Killer” (NK) (PARR et al., 1987; ZHENG et al., 1991c; LINNEMEYER e POLLACK, 1991; CROY e KISO, 1993) e mais recentemente, alguns autores têm se referido a elas como células NK uterinas (DELGADO et al., 1996; CROY et al., 1996; HEAD, 1996; POLLACK e LINNEMEYER, 1996).

Em nosso trabalho foi mantida a denominação de células granulosas metriais por melhor caracterizar tanto o aspecto morfológico quanto a localização dessas células no útero de camundongos.

A identificação e a localização das CGMs no endométrio foram baseadas nos resultados obtidos inicialmente pela reação de PAS. Esta técnica demonstrou que as CGMs apresentavam positividade nos grânulos e no citoplasma. O fato do conteúdo citoplasmático positivo ter sido removido após o tratamento com a amilase indicou a presença de carboidratos neutros nestas células. Em nossa descrição ao nível da microscopia eletrônica de transmissão, chamamos a atenção sobre a grande quantidade de glicogênio presente nessas células. Assim sendo, o substrato removido pelo tratamento com a amilase nas CGMs deve corresponder ao conteúdo de glicogênio destas células. Os cortes tratados com desoxicolato de sódio, por sua vez, não apresentaram alteração significativa na intensidade de reação ao PAS. Como o desoxicolato possui ação detergente, presume-se que o conteúdo citoplasmático das CGMs e dos grânulos não seja de natureza glicolípídica ou de lipídios redutores.

Assim sendo, o produto PAS-amilase resistente encontrado no interior dos grânulos deve ser predominantemente glicoprotéico. Resultado este que vem de encontro com os já descritos por WISLOCKI et al. (1957); BULMER e DICKSON (1960); STEWART e PEEL (1977).

Pela histoquímica de lectina, a DBA (*Dolichos biflorus*) mostrou ser altamente seletiva às CGMs encontradas no ambiente uterino, facilitando a identificação das mesma ao longo do período analisado. Nestas células foram observadas intensa marcação nos grânulos, o que está de acordo com os resultados encontrados por

DAMJANOV e DAMJANOV (1992). Salienta-se o fato de que a lectina DBA também apresentou marcações na superfície celular destas células. Com esta técnica pudemos constatar que aquelas células com grânulos PAS positivos presentes na região antimesometrial, apresentaram-se lectina-DBA negativas. Portanto, essas células não podem ser caracterizadas ou identificadas como sendo CGMs. Desta forma, pode-se considerar que a reação de PAS não é a mais indicada para a identificação e localização precisa das CGMs, enquanto a lectina DBA mostrou ser mais seletiva na identificação destas células. A seletividade da lectina DBA pode ser comprovada também ao nível ultra-estrutural que demonstrou marcação tanto sobre os grânulos quanto sobre a superfície externa da membrana plasmática das CGMs.

Por outro lado, os nossos resultados contradizem aqueles descritos por PEEL e BULMER (1996). Estes autores demonstraram que a lectina DBA não reage com as CGMs presentes em úteros de ratos. A divergência entre os resultados aqui obtidos e os relatados por PEEL e BULMER (1996) pode ser atribuída à diferença no método utilizado. O tratamento proteolítico por eles utilizado, pode ter removido o complexo glicoprotéico contendo o açúcar substrato da lectina ou mesmo, alterado seu estado conformacional.

A análise da localização e a distribuição das CGMs baseada nas técnicas histoquímicas de PAS e da lectina DBA demonstraram a presença destas células no estroma uterino ao longo de todo período estudado. No 9º ddg, as células granulosas PAS e DBA positivas estavam distribuídas por todo o endométrio decidualizado da região mesometrial. À medida em que ocorreu o processo de placentação (do 11º ao 15º ddg), verificou-se o aumento gradual no número das CGMs nesta região. Nos materiais de 13º e 15º ddg, bastante evidente foi o acúmulo destas células na porção mediana da região mesometrial acima da placenta fetal. Nos materiais de 17º ddg, na medida em que ocorria o adelgaçamento do endométrio, observou-se uma diminuição no número das mesmas.

Tais observações confirmam a descrição de LARKIN e FLICKINGER (1969) e BULMER et al. (1987), que já haviam constatado o acúmulo localizado de CGMs na região mesometrial, notório no 13º ddg. Confirmam também os achados de STEWART e PEEL (1978), que sugerem a migração das CGMs da decídua mesometrial em direção ao triângulo mesometrial. Esta concentração das CGMs na porção central e

mediana do endométrio foi denominada por SELYE e MCKEOWN (1935) de “glândula metrial”. Termo este, posteriormente consagrado e mantido por vários pesquisadores (LARKIN e FLICKINGER, 1969; STEWART e PEEL, 1978). Esta denominação de “glândula” é contestável, considerando-se que as CGMs são comprovadamente de origem medular (PEEL et al., 1983) e pertencentes a linhagem linfocitária (STEWART e PEEL, 1977; PEEL, 1989; LINNEMEYER e POLLACK, 1991).

A análise do padrão de reatividade das CGMs frente às técnicas histoquímicas utilizadas revelou ainda a ocorrência de GGMs com variações nas características fenotípicas. Além da presença de CGMs típicas aqui descritas como células do tipo 1, cuja característica é idêntica àquelas descritas na literatura (STEWART e PEEL, 1977; 1978; PARR et al., 1987; PEEL, 1989), identificamos e classificamos os subtipos 2, 3 e 4. As características destes subtipos de CGMs descritos em nossos resultados também foram relatados parcialmente por STEWART e PEEL (1977, 1978), no entanto, estes autores não as classificaram em subtipos.

As características morfológicas junto com o padrão de reatividade às técnicas histoquímicas, encontradas em cada um dos subtipos, sugerem uma seqüência de estágios relacionados com o processo de diferenciação celular. Tomando-se como referência a CGM do tipo 1, descrito como sendo a forma mais característica, pelo maior desenvolvimento do seu conteúdo de grânulos intracitoplasmáticos (PAS e DBA positivos), este poderia ser considerado a forma plenamente diferenciada. Ao nível ultra-estrutural estas células foram facilmente identificadas pelos seus grânulos citoplasmáticos que apresentavam um “cap” eletrodense característico. Estes grânulos ocupavam a região central da célula juntamente com outras organelas e o citoplasma apresentava ainda um acúmulo de glicogênio.

As células do tipo 3, que apresentaram menor número de grânulos e com o citoplasma mais basófilo, devem corresponder àquelas descritas com menor número de grânulos ao nível ultra-estrutural. Tais células estariam numa fase anterior de diferenciação em relação às CGMs do tipo 1, apresentando reações positivas para a lectina DBA, tanto nos grânulos quanto na superfície celular. Do mesmo modo, as características morfológicas das células classificadas como tipo 4 são sugestivas de um estágio de diferenciação anterior à do tipo 3. Embora o tipo 4 seja destituído de

grânulos DBA e PAS positivos, a superfície celular apresentava marcação positiva para a lectina DBA. Assim sendo, a lectina DBA identifica as células do tipo 4 que expressam glicoconjugados na superfície celular, característicos da linhagem das CGMs, que são mantidos no processo de diferenciação. A hipótese de que as células precursoras das CGMs são células pequenas e destituídas de grânulos foi sugerida por PEEL et al. (1983), os quais consideraram que, uma vez desencadeado o processo de diferenciação, estas células passariam a adquirir grânulos, que aumentariam tanto em tamanho quanto em número.

Contudo, a identificação fenotípica das formas precursoras das CGMs através de marcadores de superfície celular é ainda uma questão a ser estabelecida, uma vez que, no ambiente uterino de roedores, têm sido encontrados linfócitos de diferentes linhagens (POLLACK e LINNEMEYER, 1996; HEAD, 1996; CROY et al., 1996). Estudos que enfoquem o isolamento e identificação do glicoconjugado substrato da lectina DBA devem, portanto, prosseguir.

O aspecto da CGM do tipo 2, que apresentou como característica marcante o seu citoplasma extraído e freqüentemente vacuolizado, sugere que esta célula encontre-se já em fase de degeneração. DELGADO et al. (1996) descreveram, ao nível ultra-estrutural as CGMs do período periparto contendo gotículas lipídicas, grânulos com formas, tamanhos e textura heterogêneos, além de vacuolização citoplasmática e ruptura da membrana plasmática que caracterizam células em degeneração. Em nossas análises ultra-estruturais foram encontradas células com citoplasma francamente extraído, com pequenas gotículas lipídicas e com as organelas, inclusive os grânulos, confinadas a uma área central. Este aspecto ultra-estrutural deve corresponder à de uma CGM do tipo 2.

Assim sendo, pelos nossos resultados os subtipos 4, 3, 1, 2 caracterizariam a sequência morfológica dos estágios de diferenciação e degeneração das CGMs.

Na análise da identificação e localização das CGM, constatou-se que a frequência e distribuição dos subtipos de CGMs variaram conforme o período de gestação analisado. Enquanto nas fases precoces havia um equilíbrio entre as células dos tipos 1, 3 e 4, com o avançar da gestação, houve uma gradual diminuição dos tipos 3 e 4. Fato este facilmente identificado ao redor do 13º e 15º ddg pelo predomínio de células dos tipos 1 e 2 em relação aos tipos 3 e 4. Ao atingir o período

periparto, foi notória a diminuição das células do tipo 1 em relação ao tipo 2. Assim como em nossos resultados, onde descrevemos a ocorrência de células do tipo 2 nas fases intermediárias da gestação, DELGADO et al. (1996) relataram que a partir do 13º ddg, foram encontradas células com alterações morfológicas sugestivas de degeneração. Neste contexto, o fato das células do tipo 2 serem encontradas em maior número no 17º ddg, mas não restrita a esta fase, sugere também que o processo de degeneração das CGMs não esteja restrito ao período final da gestação.

Da mesma forma, o fato de serem encontrados os 4 subtipos, em todos os estágios analisados, sugere que o processo de diferenciação das CGMs seja desencadeado no ambiente uterino ao longo do período gestacional.

Devido à semelhança das CGMs com as células imunologicamente competentes da linhagem de linfócitos citolíticos, muitas funções têm sido atribuídas às CGMs (STEWART, 1984; STEWART e MUKHTAR, 1988; ZHENG et al., 1991c; CROY, 1994). Entre elas podemos citar sua atuação na lise de células trofoblásticas “in vitro” (STEWART, 1984; STEWART e MUKHTAR, 1988) e na barreira para invasão de microorganismos junto ao feto (ZHENG et al., 1991c). Mais recentemente, tem sido proposta a função de degradação da matriz extracelular na preparação para a separação da placenta no parto (CROY, 1994; DELGADO et al., 1996; CROY et al., 1996). As possíveis funções acima atribuídas às CGMs estão fundamentadas no seu conteúdo de grânulos e na eventualidade da ocorrência da degranulação.

Os grânulos citoplasmáticos das CGMs apresentam uma peculiaridade morfológica que permite facilmente a sua identificação. Ao nível ultra-estrutural, apresentam variações na forma e eletrodensidade, porém se caracterizam pela organização de um centro homogêneo e um capuz (“cap”) freqüentemente mais eletrodenso, localizado periféricamente. O “cap” por sua vez, é constituído de estruturas membranosas vesiculares e tubulares, e eventualmente apresentam estruturas de arranjo cristalino.

O fato de que em alguns casos não encontramos a região do “cap” nos grânulos, não significa que o mesmo não esteja presente no grânulo. Conforme salientado por DELGADO et al. (1996), um determinado plano de corte pode não ter atingido o “cap”. No entanto, chama a atenção em nossos resultados, a variação na eletrodensidade dos grânulos, tanto na região central homogênea quanto no “cap”, fato

este não relatado por DELGADO et al. (1996). Esta heterogeneidade no aspecto dos grânulos encontrada em nossos resultados sugere uma relação com os estágios de maturação do grânulo, à semelhança do que ocorre nos grânulos de secreção de outros tipos celulares.

Esses grânulos também foram descritos em camundongos por STEWART e PEEL (1977), que ressaltaram as diferenças morfológicas com aqueles encontrados em CGMs de ratos.

Segundo LARKIN e CARDELL (1971), os grânulos de CGMs de ratos também apresentam um “cap” membranoso, contendo estruturas em figura de mielina. Mas estes autores não mencionam a presença de estruturas membranosas tubulares e cristalinas.

Os resultados da citoquímica com a lectina DBA, demonstrando a distribuição de marcação no interior dos grânulos das CGMs e ausência nos controles, comprovam a presença de glicoproteínas contendo resíduos de N-acetil galactosamina terminais. DAMJANOV e DAMJANOV (1992), sugerem que a reatividade da lectina DBA com as CGMs de ratos e camundongos seria devida à sua ligação com uma esterase. A presença de serina-esterase foi detectada nas CGMs de ratos por BULMER (1965) e de camundongos por ZHENG et al. (1991b). A presença da serina esterase tem também sido descrita nos grânulos das células T citotóxicas e “limphokine-activated killer cells” (OJCIUS et al., 1991). Assim sendo, a positividade da lectina DBA detectada nos grânulos das CGMs em nossos materiais poderia ser atribuída à presença de serina-esterase no interior destes.

Contudo, as lectinas não são marcadores de macromoléculas específicas, mas sim de um açúcar específico, no caso da DBA, o N-acetil galactosamina. Este açúcar pode estar associado a diversos glicoconjugados, o que não nos permite caracterizar a lectina DBA como marcador exclusivo das CGMs somente pela marcação nos grânulos, como sugerido por DAMJANOV e DAMJANOV (1992). Não obstante, a marcação na superfície celular aliada à dos grânulos parece ser uma particularidade destas células, permitindo a utilização da lectina DBA como um marcador das CGMs no ambiente uterino.

Em nossos resultados foi relatada a reação positiva para as anticatepsinas D e B no citoplasma das CGMs pela técnica imunocitoquímica. Nestas reações pudemos

verificar que os sítios de marcação concentravam-se nos grânulos, preferencialmente na periferia dos mesmos. A imunomarcação positiva para as anticatapsinas D e B nestas células pressupõe que o conteúdo dos grânulos seja de natureza lisossômica. Tal achado vem de encontro aos resultados de BULMER (1963, 1965 e 1968a,b) que detectou outras enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -glucuronidase, fosfatase ácida, arilsulfatase) relacionadas aos lisossomos nas CGMs de ratos.

Na imunomicroscopia eletrônica, as partículas de ouro foram encontradas predominantemente na região correspondente ao “cap” dos grânulos, explicando o padrão de marcação periférica dos mesmos, encontrado nas reações ao nível da microscopia fotônica. Tal resultado indica que as enzimas catapsinas D e B ocupam uma região definida do grânulo, sugerindo, portanto, que a região correspondente ao “cap” possa ser um compartimento lisossômico. Porém, o fato das catapsinas D e B estarem presentes especificamente no “cap” dos grânulos, não significa que outras enzimas lisossômicas também estejam restritas a esta região, ou ainda que o “cap” seja um domínio exclusivamente de enzimas lisossômicas.

A localização preferencial da catapsina D na região do “cap” tem sido descrita também nos grânulos de células NK de ratos (BURKHARDT et al., 1990). Estes autores já sugeriam que o “cap” seja um compartimento pré-lisossômico. Tal localização descrita para a catapsina D nas células NK pode ser interpretado como um elemento adicional que comprova as semelhanças das CGMs com as células NK.

Embora a catapsina D seja descrita como uma aspartil proteinase lisossômica e com comprovada ação proteolítica sobre vários substratos celulares, como, hemoglobina (IKEDA et al., 1989) e colágeno (HELSETH e VEIS, 1984), dados recentes atribuem a essa enzima o importante papel na ativação de pró-enzimas em formas ativas (NISHIMURA et al., 1988). No processo de conversão intracelular de outras enzimas, como da pró-catapsina B em catapsina B, sugere-se a necessidade da presença da catapsina D (NISHIMURA et al., 1988). No caso dos grânulos das CGMs, onde as catapsinas D e B coexistem, é plausível supor que a catapsina D poderia atuar como ativadora da enzima catapsina B. Neste mecanismo, a catapsina D estaria envolvida indiretamente na função lítica do conteúdo dos grânulos, onde a catapsina B seria secretada na sua forma ativa durante a degranulação das CGMs.

PARR et al. (1990b) e ZHENG et al. (1991b) detectaram a presença de perforina no interior dos grânulos das CGMs de camundongos. Em células NK, a perforina é considerada o efector principal na lise de células-alvo através da sua ação ao nível da membrana plasmática (YOUNG et al., 1986 e 1990). Paralelamente, a catepsina D tem sido descrita como sendo uma das enzimas proteolíticas que podem ser potencialmente secretadas para o meio extracelular. Nota-se o caso das células tumorais que, no seu processo de metástase, a secreção da catepsina D parece ser um fator determinante (SPYRATOS et al., 1989; TANDON et al., 1990; LETO et al., 1992; SCAMBIA et al., 1994). Desta forma, é plausível supor que a catepsina D seja um componente proteolítico efetivamente liberado junto com os demais componentes líticos na degranulação das CGMs.

O fenômeno da degranulação no ambiente uterino parece ocorrer concomitantemente com o processo de degeneração das CGMs (DELGADO et al., 1996). Segundo estes autores, no último estágio de diferenciação das CGMs, estas entram em um lento processo de morte celular associado com o desaparecimento das CGMs no útero próximo ao parto. Estes autores observaram, ainda, que os grânulos sofrem mudanças estruturais e texturais antes do seu conteúdo ser liberado, supondo que as CGMs sofram ruptura em locais pré-determinados.

Contudo, em nossas observações, não foram encontrados flagrantes morfológicos de degranulação destas células, ou qualquer outra evidência de liberação do conteúdo granular para o meio extracelular. Da mesma forma, não foi encontrada imunomarcação para anticatapsina D em compartimentos extracelulares próximos às CGMs.

Embora os experimentos “in vitro” mostrem evidências de que as CGMs possam lisar células trofoblásticas gigantes (STEWART e MUKHTAR, 1988), bem como, uma vez ativadas pela IL-2, lisam células YAC-1 (CROY et al., 1991b), não há ainda qualquer relato de experimentos “in situ”, que permita relacionar um fenômeno de causa/efeito na degranulação das CGMs.

Os nossos resultados mostram a ocorrência de um acúmulo gradual de CGMs na região do triângulo mesometrial correspondente à “glândula metrial” o qual, no final da gestação reduz o número destas células. Tal ocorrência localizada de células linfocitárias “NK-like”, em período definido da gestação, sugere a organização de um

tecido linfóide transitório de relevância na gravidez. Este tecido linfóide caracteriza-se sobretudo por se constituir em um sítio onde ocorre a diferenciação de células potencialmente citolíticas. No entanto, considerando-se que mesmo em animais depletados de células NK (inclusive as CGMs) foi constatada a viabilidade da gestação plena em camundongos (CROY et al., 1996; GUIMOND et al., 1997); as células “NK-like” não seriam, então, imprescindíveis para a gestação. Assim sendo, permanece intrigante o fato de não se poder atribuir uma atuação efetiva destas células no sucesso ou no colapso da gestação.

## **7. CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- Tanto a técnica histoquímica de PAS quanto a da lectina DBA permite identificar as Células Granulosas Metriais (CGMs) no endométrio de camundongos, devido ao conteúdo glicoprotéico dos grânulos intracitoplasmáticos.

- A lectina DBA reage tanto com o conteúdo granular quanto com os componentes da membrana plasmática, o que permite identificar quatro subtipos de CGMs.

- Os quatro subtipos (1, 2, 3 e 4) de CGMs encontrados, devem representar as formas morfológicamente identificáveis dos estágios de diferenciação destas células no ambiente uterino, e a frequência desses subtipos variam de acordo com o período gestacional.

- A morfologia do subtipo 4 (destituída de grânulos) sugere que esta célula seja a forma precursora das CGMs no ambiente uterino.

- A morfologia do subtipo 2 sugere um aspecto de célula em degeneração, e a ocorrência maior desse subtipo no útero, coincide com os períodos mais adiantados da gestação.

- A imunistoquímica revela a presença de enzimas lisossômicas, catepsinas D e B no interior das CGMs, sugerindo a natureza lisossômica dos grânulos.

- As catepsinas D e B sendo localizadas especificamente na região do “cap” dos grânulos, pela imunomicroscopia eletrônica, sugerem uma subcompartimentalização funcional dos grânulos das CGMs.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BLUMENTHAL, R.; MILLARD P. J.; HENKART, M. P.; REYNOLDS, C. W. e HENKART, P. A. Liposomes as a targets for granule cytolisin from cytotoxic large granular lymphocyte. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 5551-5555, 1984.
- BRAGA, V. M. M. e GENDLER, S. J. Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J. Cell Sci.*, v. 105, p. 397-405, 1993.
- BULMER, D. The histochemical distribution of  $\beta$ -glucoronidase activity in the rat placenta. *J. Anat.*, v. 97, p. 181-187, 1963.
- BULMER, D. Esterase and acid phosphatase activities in the rat placenta. *J. Anat.*, v. 99, p. 513-525, 1965.
- BULMER, D. Further studies on the granulated metrial gland cells of the pregnant rat. *J. Anat.*, v. 103, p. 479-489, 1968a.
- BULMER, D. A histochemical study of the aryl sulfatases of the rat placenta. *Anat. Rec.*, v. 160, p. 735-740, 1968b.
- BULMER, D. e DICKSON, A. D. Observations on carbohydrate materials in the rat placenta. *J. Anat.*, v. 94, p. 46-58, 1960.
- BULMER, D.; STEWART, I. e PEEL, S. Endometrial granulocytes of the pregnant hamster. *J. Anat.*, v. 136, p. 329-337, 1983.

- BULMER, D.; PEEL, S. e STEWART, I. The metrial gland. *Cell Differ.*, v. 20, p. 77-86, 1987.
- BURKHARDT, J. K.; HESTER, S.; LAPHAM, C. K. e ARGON Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J. Cell Biol.*, v. 111, n.6 pt.1, p. 2327-2340, 1990.
- CHAMBERS, W. H.; VUJANOVIC, N. L.; DELEO, A. B.; OLSZOWY, M. W.; HERBERMAN, R. B. e HISERODT, J. C. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine activated killer cells. *J. Exp. Med.*, v. 169, p. 1373-1389, 1989.
- CHATTERJEE-HASROUNI, S. e LALA, P. K. Localization of H-2 antigens on mouse trophoblast cells. *J. Exp. Med.*, v. 149, p. 1238-1253, 1982.
- CHEN, H. L.; YELAVARTHI, K. K. e HUNT, J. S. Identification of transforming growth factor-Beta1 mRNA in virgin and pregnant rat uteri by in situ hybridization. *J. Reprod. Immunol.*, v.25, p. 221-233, 1993.
- CROY, B. A. Granulated metrial gland cells: hypotheses concerning possible functions during murine gestation. *J. Reprod. Immunol.*, v. 27, p. 85-94, 1994.
- CROY, B. A.; GUILBERT, L. J.; BROWNE, M. A.; GOUGH, N. M.; STINCHCOMB, D. T.; REED, N. e WEGMANN, T. G. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, v. 19, n. 2, p. 149-166, 1991a.

- CROY, B. A.; LUROSS, J. A.; GUIMOND, M. J. e HUNT, J. S. Uterine natural killer cells: insights into lineage relationships and functions from studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. *Nat. Immun.*, v. 15, p. 22-33, 1996.
- CROY, B. A. e KASSOUF, S. Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. *J. Reprod. Immunol.*, v. 15, p. 51-69, 1989.
- CROY, B. A. e KISO, Y. Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microsc. Res. Tech.*, v. 25, p. 189-200. 1993.
- CROY, B. A.; REED, N.; MALASHENKO, B. A.; KIM, K. e KWON B. S. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. *Cell Immunol.*, v. 133, p. 116-126, 1991b.
- DAMJANOV, A. e DAMJANOV I. Isolation of serine protease from granulated metrial gland cells of mice and rats with lectin from *Dolichos biflorus*. *J. Reprod. Fert.*, v. 95, p. 679-684, 1992.
- DEBOUT, C. e IZARD, J. A comparison of granulated metrial gland cells with Kurloff cells in the guinea-pig. *Placenta*, v. 15, p. 669-672, 1994.
- DELBRÜCK, R.; DESEL, C.; VON FIGURA, K. e HILLE-REHFELD, A. Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 64, p. 7-14, 1994.

- DELGADO, R. S.; MCBEY, B. A.; YAMASHIRO, S.; FUJITA, J.; KISO, Y. e CROY, B. A. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leuk. Biol.*, v.59, p.262-269, 1996.
- DICKSON, A. D. Migration of metrial gland cells in the mouse. *J. Anat.*, v. 131, p. 255-262, 1980.
- DIXON, J. S. e BULMER, D. The fine structure of cells in the rat metrial gland. *J. Anat.*, v. 108, p. 123-133, 1971.
- DIMENT, S.; LEECH, M. S. e STAHL, P. D. Cathepsin D is membrane associated in macrophage endosomes. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 6901-6907, 1988.
- ELLIS, R. A. Histochemistry of the cellular components of the metrial gland of the rat during prolonged pseudopregnancy. *Anat. Rec.*, v. 129, p. 39-52, 1957.
- ERICKSON, A. H. e BLOBEL, G. Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, v. 254, n. 23, p. 11771-11774, 1979.
- FELLEISEN, R. e KLINKERT, M. O. "In vitro" translation and processing of cathepsin B of *Shistosoma mansoni*. *EMBO J.*, v.9, p. 371-377, 1990.
- FREEMAN, H. Lectin histochemistry of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon neoplasia. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 31, p. 1241-1245, 1983.

- FREY, T.; PETTY, H. R. e MCCONNEL, H. M. Electron microscopic study of natural killer cell-tumor cell conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 5317-5321, 1982.
- GINSBURG, H.; COLEMAN, R.; DAVIDSON, S.; KHOURY C. e MOR, R. Lymphokine activated killer (LAK) cells are identical to the uterine granulated metrial gland (GMG) cells. *Transplant. Proc.*, v. 21, p. 186-189, 1989.
- GOSSELIN, P.; LUSIGNAN, Y. e LEMIEUX, S. The murine NK2.1 antigen: a 130 kDa glycoprotein dimer expressed by a natural killer cell subset of the spleen, thymus and lymphonodes. *Molec. Immunol.*, v. 30, p. 1185-1193, 1993.
- GROSCURTH, P.; QIAO, B. Y.; PODACK, E. R. e HENGARTNER, H. Cellular localization of perforin 1 in murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, v.138, p. 2749-2752, 1987.
- GUIMOND, M. J.; LUROSS, J. A.; WANG, B.; TERHORST, C.; DANIAL, S. e CROY, B. A. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol. Reprod.*, v. 56, p. 169-179, 1997.
- HASILIK, A. The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia*, v. 48, p. 130-150, 1992.
- HASILIK, A.; VON FIGURA, K.; CONZELMANN E.; NEHRKORN H. e SANDHOFF K. Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, v. 125, p. 317-321, 1982.

- HEAD, J. R. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. *Nat. Immun.*, v. 15, p. 7-21, 1996.
- HEAD, J. R.; KRESGE C. K.; YOUNG, J. D. e HISERODT, J. C. NKRP-P1+ cells in the rat uterus : granulated metrial gland cells are of the natural killer cell lineage. *Biol. Reprod.*, v. 51, p. 509-523, 1994.
- HELSETH, JR. D. L. e VEIS, A. Cathepsin D mediated processing of procollagen, lysosomal enzyme involvement in secretory processing of procollagen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 81, n. 11, p. 3302-3306, 1984.
- HENNINGAR, R. A.; SCHULTE, B. A. e SPICER, S. S. Heterogeneous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules. *Anat. Rec.*, v. 211, p. 376-390, 1985.
- HUNT, J.S. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol. Reprod.*, v. 50, p. 461-466, 1994.
- IKEDA, K.; SUZUKI, H.; OKANO, T. e NAKAGAWA, S. Human spleen cathepsin D: its characterization and localization in human spleen. *Int. J. Biochem.*, v. 21, n. 3, p. 317-326, 1989.
- JENKINSON, J. W. Observations on the histology and phisiology of the placenta of the mouse. *Tijdschr. Ned. Dierg. Vereeniging*, v. 2, n. 7, p. 124-207, 1902.
- KASAI, M.; IWAMORI, M.; NAGAI, Y.; OKUMURA, K. e TADA, T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*, v. 10, p. 175-189, 1980.

- KATUNUMA, N. e KOMINAMI, E. Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitors. *Curr. Top. Cell Regul.*, v. 209, p. 67-75, 1983.
- KIRSCHE, H.; KEMBHAVI, A. A.; BOHLEY, P. e BARRET, A. J. Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochem. J.*, v. 201, p. 367-372, 1982.
- KIRSCHE, H.; LANGNER, J.; RIEMANN, S.; WIEDERANDERS, B.; ANSORGE, S. e BOHLEY, P. Lysosomal cysteine proteinases. In: Protein degradation in health and disease. *Excerpta Med. Ciba Foundation Symposium*, v. 75, p. 5-35, 1980.
- KOMINAMI, E.; TSUKAHARA, T.; HARA, K. e KATUNUMA, N. Biosynthesis and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.*, v. 231, p. 225-228, 1988.
- LADEN, S. A.; SCHULTE, B. A. e SPICER, S. S. Histochemical evaluation of secretory glycoproteins in human salivary glands with lectin horseradish peroxidase conjugates. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 32, p. 965-972, 1984.
- LARKIN, L. H. e CARDELL, R. R. Differentiation of granulated metrial gland cells in the uterus of the pregnant rat: an electron microscopic study. *Am. J. Anat.*, v. 132, p. 241-258, 1971.
- LARKIN, L. H. e FLICKINGER, C. J. Ultrastructure of the metrial gland cell in the pregnant rat. *Am. J. Anat.*, v. 126, p. 337-354, 1969.

- LEE, M. e DAMJANOV, I. Anatomic distribution of lectin binding sites in mouse testis and epididymis. *Differentiation*, v. 27, p. 74-81, 1984.
- LETO, G.; GEBIA, N.; RAUSA, L. e TUMMINELLO, F. M. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases. *Anticancer Res.*, v. 12. p. 235-240, 1992.
- LINNEMEYER, P. A. e POLLACK, S. B. Murine granulated metrial gland cells at uterine implantation sites are natural killer lineage cells. *J. Immunol.*, v. 147, p. 2530-2535, 1991.
- MACH, L.; MORT, J. S. e GLÖSSL, J. Maturation of human procathepsin B. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 13030-13035, 1994.
- MACDERMOTT, R. P.; SCHMIDT, R. E.; CAULFIELD, J. P.; HEIN, A.; BARTLEY, G. T.; RITZ, J.; SCHLOSSMAN, S.; AUSTEN, K. F. e STEVENS, R. L. Proteoglycans in cell-mediated cytotoxicity: identification, localization, and exocytosis of a chondroitin sulfate proteoglycan from human cloned natural killer cells during target cell lysis. *J. Exp. Med.*, v. 162, p. 1771-1797, 1985.
- MITCHELL, B. S.; CRAGGS, R. I. e PEEL, S. Localization of immunoglobulin (IgG) in granulated metrial gland cells of deciduomata of the pseudopregnant rat. *J. Reprod. Immunol.*, v. 3, p. 237-241, 1981.
- MITCHELL, B. S. e PEEL, S. Leucocyte surface antigens in metrial gland tissue of variectomized pregnant rats, deciduomata-bearing rats and in uterine tissue of non-pregnant rats. *Immunol.*, v. 58. p. 297-301, 1986.

- MUKHTAR, D. D. Y.; STEWART, I. J. e CROY, B. A. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, v. 15, p. 269-279, 1989.
- NAKAGAWA, F.; SCHULTE, B. A.; SENS, M. A.; KOCHIBE, N. e SPICER, S. S. Lectin cytochemistry of cell types in human and canine pituitary. *Histochemistry*, v. 85, p. 57-66, 1986.
- NISHIMURA, Y.; KAWABATA, T. e KATO, K. Identification of latent procathepsin B and L in microsomal lumen: characterisation of enzymatic activation and proteolytic processing "in vitro". *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 261, p. 64-71, 1988.
- OJCIUS, D. M.; ZHENG, L. M.; SPHICAS, E. C.; ZYCHLINSKY, A. e YOUNG J. D. E. Subcellular localization of perforin and serine esterase in lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells by immunogold labeling. *J. Immunol.*, v. 146, n. 12, p. 4427-4432, 1991.
- PARR, E. L.; PARR, M. B. e YOUNG, J. D. E. Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. *Biol. Reprod.*, v. 37, p. 1327-1335, 1987.
- PARR, E. L.; SZARY, A. e PARR M. B. Measurement of natural killer activity and target cell binding by mouse metrial gland cells isolated by enzymic or mechanical methods. *J. Reprod. Fertil.*, v. 88, p. 283-294, 1990a.
- PARR, E. L.; YOUNG L. H. Y.; PARR M. B. e YOUNG J. D. E. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.*, v. 145, n. 7, p. 2365-2372, 1990b.

- PEEL, S. Granulated metrial gland cells. *Adv. Anat Embriol.Cell Biol.*, v. 115, p. 1-112, 1989.
- PEEL, S. e ADAM, E. The killing of rat placental cells by rat and mouse granulated metrial gland cells in vitro. *Placenta.*, v.12, p. 161-171, 1991.
- PEEL, S. e BULMER, D. The fine structure of the rat metrial gland in relation to the origin of the granulated cells. *J. Anat.*, v. 123, p. 687-696, 1977.
- PEEL, S. e BULMER, J. N. Lectin histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J. Anat.*, v. 188, p. 197-205, 1996.
- PEEL, S.; STEWART, I. e BULMER, D. Metrial gland cells in deciduomata of pseudopregnancy. *J. Anat.*, v. 129, p. 21-30, 1979.
- PEEL, S.; STEWART, I. e BULMER D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. *Cell Tissue Res.*, v. 233, p. 647-656, 1983.
- PODACK, E. R. J.; YOUNG, J. D. E. e COHN, Z. A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin-1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 8629-8633, 1985.
- POLLACK, S. B. e LINNEMEYER, P. A. Natural killer cells in the nonpregnant murine uterus. *Nat. Immun.*, v. 15, p. 34-40, 1996.

- REDLINE, R. W. e LU, C. Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leucocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab. Invest.*, v. 61, p. 27-36, 1989.
- RIJNBOUTT S.; KAL A. J.; GEUZE H. J.; AERTS H. e STROUS G. J. Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 23586-23592, 1991.
- ROSSANT, J. e CROY, B. A. Genetic identification of tissue of origin of cellular populations within the mouse placenta. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 86, p. 177-189, 1985.
- ROWAN, A.; MASON P.; MACH L. e MORT J. S. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15993-15999, 1992.
- RYAN, J. C.; TURCK, J.; NIEMI, E. C.; YOKOYAMA, W. M. e SEAMAN, W. E. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J. Immunol.*, v. 149, p. 1631-1635, 1991.
- SALMINEN A. e GOTTESMAN, M. M. Inhibitor studies indicate that active cathepsin L is probably essential to its own processing in cultured fibroblasts. *Biochem. J.*, v. 272, p. 39-44, 1990.
- SANTONI, A.; GISMONDI, A.; MORRONE, S.; PROCOPIOK, A.; MODESTI, A.; SCARPA, S.; D'ORAZI, G.; PICOLLI, M. e FRATI, L. Rat natural killer cells synthesise fibronectin: possible involvement in the cytotoxic function. *J. Immunol.*, v. 143, p. 2415-2421, 1989.

- SCAMBIA, G.; PANICI, P. B.; FERRADINA, G.; SALERNO, G.; D'AUGOSTINO, G.; DISTEFANO, M.; DEVICENSO, R.; ERCOLI, A. e MANCUSO, S. Clinical significanse of cathepsin D in primary ovarian cancer. *Eur. J. Cancer*, v. 30 A, p. 935-940, 1994.
- SEGUNDO, B. S.; CHAN, S. J. e STEINER, D. F. Identification of cDNA clones encoding a precursor of rat liver cathepsin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 2320-2324, 1985.
- SELYE, H. e MCKEOWN, T. Studies on the physiology of the maternal placenta in the rat. *Proc.R. Soc.Lond.Biol.*,v.119, p.1-31, 1935.
- SHARON, N. e LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, p. 74-81, jan/1993.
- SIMON, D. I.; EZRATTY, A. M. e LOSKALZO, J. The fibrin(ogen)olytic properties of cathepsin D. *Biochem.*, v. 33, n. 21, p. 6555-6563, 1994.
- SPYRATOS, F.; BROUILLET, J. P.; DEFRENNE, A.; HACENE, K.; ROUESSE, J. e MAUDELOND, T. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet*, v. 2, p. 1115-1118, 1989.
- STALLMACH, T.; EHRENSTEIN, T.; ISENMANN, S.; MÜLLER, C.; HENGARTNER, H. e KÄGI, D. The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, v. 25, p. 3342-3348, 1995.
- STEWART, I. J. An investigation into the differentiation of granulated metrial gland cells in the early pregnant mouse uterus. *J. Anat.*, v. 137, p. 85-93, 1983.

- STEWART, I. J. A morphological study of granulated metrial gland cells and trophoblast cells in the labyrinthine placenta of the mouse. *J. Anat.*, v. 139, n. 4, p. 627-638, 1984.
- STEWART, I. J. Granulated metrial gland cells in lungs of mice in pregnancy and pseudopregnancy. *J. Anat.*, v. 140, p. 551-563, 1985.
- STEWART I. J. Granulated metrial gland cells in the mouse placenta. *Placenta*, v. 11, n. 3, p. 263-275, 1990.
- STEWART, I. J. Granulated metrial gland cells: pregnancy specific leucocytes? *J. Leukocyte Biol.*, v. 50, p. 198-207, 1991.
- STEWART, I. J. e CLARKE, J. R. Granulated metrial gland cells in the uterine wall and placenta of the pregnant woodmouse, *Apodemus sylvaticus*. *J. Anat.*, v. 186, p. 411-415, 1995.
- STEWART, I. e MUKHTAR, D. D. Y. The killing of mouse trophoblast cells by granulated metrial gland cells in vitro. *Placenta*, v. 9, p. 417-425, 1988.
- STEWART, I. e PEEL, S. The structure and differentiation of granulated metrial gland cells of the pregnant mouse uterus. *Cell Tissue Res.*, v. 184, n. 4, p. 517-527, 1977.
- STEWART, I. e PEEL, S. The differentiaton of the decidua and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell Tissue Res.*, v. 187, n. 1, p. 167-179, 1978.

- STEWART, I. e PEEL, S. Granulated metrial gland cells at implantion sites of the pregnant mouse uterus. *Anat. Embryol. (Berl)*, v. 160, p. 227-238, 1980.
- STOUT, R. D.; SCHWARTING, G. A. e SUTTLES, J. Evidence that expression of Asialo-GM1 may be associated with cell activation. Correlation of Asialo-GM1 expression with increased total cellular RNA and protein content in normal thymocyte and spleen cell subpopulations. *J. Immunol.*, v. 139, p. 2123-2129, 1987.
- TAKAHASHI, S.; MURAKAMI, K. e MIYAKE, Y. Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isozyme. *J. Biochem.*, v. 91, p. 419-422, 1982.
- TANDON, A. K.; CLARK, G. M.; CHAMNESS, C. G.; CHIRGWIN, J. M. e MCGUIRE, W. L. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, p. 297-302, 1990.
- TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.*, v. 47, p. 187-376, 1989.
- TSCHOPP, J. e NABHOLZ, M. Perforin-mediated target cells lysis by cytolytic T lymphocytes. *A. Rev. Immun.*, v. 8, p. 279-302, 1990.
- UCHIYAMA, Y.; WAGURI, S.; SATO, N.; WATANABE, T.; ISHIDO, K. e KOMINAMI, E. Review: cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, H, and L, and their biological roles. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 27, n. 4, p. 287-308, 1994.

- VANDEN H. M.; MCBEY, B. A.; HAHNEL, A. C. e CROY, B. A. An analysis of the uterine lymphocyte-derived hybridoma cell line GWM-1 for expression of receptors for estrogen, progesterone and interleukin-2. *J. Reprod. Immunol.*, v. 31, p. 37-50, 1996.
- VELARDO, J. T.; DAWSON, A. B.; OLSEN, A. G. e HISAW, F, L. Sequence of histological changes in the uterus and vagina of the rat during prolongation of pseudopregnancy associated with the presence of deciduomata. *Am. J. Anat.*, v. 93, p. 273-305, 1953.
- VICARI, A. P. e ZLOTNIK, A. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol. Today*, v. 17, p. 71-76, 1996.
- WISLOCKI, G. B.; WEISS, L. P.; BURGOS, M. H. e ELLIS, R. A. The cytology, histochemistry and electron microscopy of the granular cells of the metrial gland of the gravid rat. *J. Anat.*, v. 91, p. 130-140, 1957.
- YE, W.; ZHENG, L. M.; YOUNG, J. D. E. e LIU, C. C. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.*, v. 184, p. 2405-2410, 1996.
- YOKOTA, S.; NISHIMURA, Y.; KAWABATA, T. e KATO, K. Immunoenzyme localization of cathepsins in the Golgi region of rat hepatocytes and renal tubule cells. *Histochem.*, v. 94, p. 629-635, 1990.
- YOKOTA, S.; TSUJI, H. e KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat Kidney. I. Light microscopic study using the indirect immunoenzyme technique. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 34, n. 7, p. 891-897, 1986a.

- YOKOTA, S.; TSUJI, H. e KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat Kidney. II. Electron microscopic study using the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 34, n. 7, p. 899-907, 1986b.
- YOUNG, L. H. Y.; FOSTER, C. S. e YOUNG, J. D. E. *In vivo* expression of perforin by natural killer cells during a viral infection. studies on uveitis produced by herpes simplex virus. *Am. j. Path.*, v.136, p. 1021-1030, 1990.
- YOUNG, J. D. E.; HENGARTNER, H.; PODACK, E. R. e COHN, Z. A. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell*, v. 44, p. 849-859, 1986.
- ZAGURY, D. Direct analysis of individual killer T cells: susceptibility of target cells to lysis and secretion of hydrolytic enzymes by CTL. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 146, p. 149-163, 1982.
- ZHENG, L. M.; LIU, C. C., OJCIUS, D. M. e YOUNG, J. D. E. Expression of lymphocyte perforin in the mouse uterus during pregnancy. *J. Cell Sci.*, v. 99, p. 317-323, 1991a.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M.; LIU, C. C.; KRAMER, M. D.; SIMON, M. M.; PARR, E. L. e YOUNG, J. D. E. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. *FASEB J.*, v. 5, p. 79-84, 1991b.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M. e YOUNG, J. D. E. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 25, p. 72-76, 1991c.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M. e YOUNG, J. D. E. Perforin-expressing cells during spontaneous abortion. *Biol. Reprod.*, v. 48, p. 1014-1019, 1993.

ZUKER-FRANKLIN, D.; GRUSKY, G. e YANG, J. S. Arylsulfatase in natural killer cells: its possible role in cytotoxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 6977-6981, 1983.