

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



ANDRÉA MOLLIKA DO AMARANTE

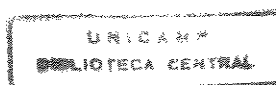
ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DAS CATEPSINAS
D e B EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
GIGANTES DE CAMUNDONGOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Andréa Mollika do Amarante
e aprovada pela Comissão Julgadora.
02/08/97

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 T. YAMADA

Campinas, 1997



9711308

UNIDADE	BC
CHAMADA:	P/Unicamp
km	13e
Ex.	
NO 85/	31685
END	284/97
C	☐
D	☒
VAL	R\$ 11,00
DATA	18/09/97
CPD	

CM-00101072-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

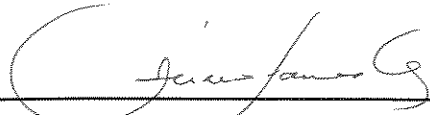
Aml3. Amarante, Andréa Mollica do
Estudo imunocitoquímico das catepsinas D e B em
células trofoblásticas gigantes de camundongos/Andréa
Mollica do Amarante. - - Campinas, SP : [s.n.] ., 1997.
97f: ilustr.

Orientador: Áureo T. Yamada
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de biologia.

1. catepsina. 2. Imunocitoquímica. 3. trofoblasto.
I. Yamada Áureo T. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título

Defesa de Tese realizada em 01 /agosto / 1997

Banca Examinadora



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



Prof. Dr. Paulo A. Abrahamsohn
Depto. Histologia e Embriologia/ICB-USP



Prof. Dra. Sima G. Katz
Depto. Morfologia/EPM-UNIFESP

Prof. Dra. Maria Luiza S. Mello
Depto. Biologia Celular/IB-UNICAMP

*“A arte e a ciência buscam coisas
semelhantes pois são modelos de busca
da expressão humana que se
completam. A arte está na ciência e a
ciência está na arte. Não existe
separação!”*

Gilberto Gil

Dedico este trabalho,

ao meu filho Bruno,

que em muitos momentos

desta sua primeira infância

teve que deparar-se com a

minha ausência.

Agradecimentos Especiais:

*A “Tia Bastos” (in memoriam), pelo exemplo da
imensa alegria de viver...*

*Aos meus pais que não só me deram a base mas
me ajudaram a consolidar o alicerce que me permitiu
construir a pessoa em que me transformei.*

*Ao meu orientador, Prof^º Dr. Áureo T. Yamada,
por toda a dedicação empenhada na minha formação
científica e acadêmica.*

*Ao Marcelo pelo apoio e carinho dos últimos dias.
(Ah, e pelo socorro com as pranchas também!!!).*

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Morfologia ter me recebido como Aluna.

A Prof^a Dr^a. Maria do Carmo Alberto Rincon, pela amizade, carinho, companheirismo e principalmente pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Paulo P. Juazeiro pelas sugestões e participação em diversas etapas deste trabalho.

A todos os demais professores do Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP pelo carinho que me acolheram e por todo o conhecimento transmitido.

Ao Prof Dr. Paulo A. Abrahamsohn, a Prof^a Dr^a. Maria Luisa S Mello e a Prof^a Dr^a e Sima G. Katz pelas correções e sugestões durante a análise prévia desta tese.

Aos colegas do grupo “Interação Materno-fetal”: Iris, Carlos, Priscila, Celina, Jr e Gianca pela convivência e companheirismo.

Aos colegas de pós graduação: Júlio, Cris, Pati 1, Pati 10, Rosaema, Luciana, Carmem Lúcia, Kleber, Luzdalma pela convivência durante estes anos onde com certeza aprendemos e crescemos juntos.

Aos técnicos Baltazar, Marta Leonardo, Marta Almeida e D. Maria pelo serviço de apoio técnico e especialmente, a Cleuza que tanto me socorreu com o preparo de soluções.

A Vânia, Rita e Helena pelo apoio nas mais diversas atividades e por terem sempre torcido por mim.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica IB-UNICAMP pela atenção que me concederam e pelos ensinamentos no manuseio dos equipamentos.

Ao Laboratório de Biologia da Reprodução e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do ICB USP-SP

A Prof^a Dr^a Mary Anne Heide Dolder pela boa vontade, ajuda com a microscopia eletrônica e pelo consentimento do uso do ultramicrotomo

As minhas irmãs e ao meu cunhado pela força que me deram.

Aos amigos: Dani, Aldo, Laura, Demétrios, Paulo, Liomar, Juliana e Rosabel por serem amigos verdadeiros e por estarem por perto nos momentos que mais precisei.

Ao Tiago e a Flávia pela correção dos textos em inglês

As meninas da graduação por tantas vezes terem tomado conta do Bruno na cantina quando eu me estendia nos procedimentos laboratoriais.

A turma da FEF pelo socorro nos momentos em que eu não tinha com quem deixar meu filho.

A Mônica, Macarena e Larissa pela companhia do dia a dia.

A Eunice e ao Daniel pela compreensão devido a tantos momentos em que a minha dissertação ocupou o Prof. Áureo fora do expediente de trabalho.

A FAPESP, CAPES e CNPq pelos auxílios e bolsas que me foram concedidos tornando possível a realização deste trabalho.

A UNICAMP pela moradia que me foi concedida durante o curso.

A todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para o andamento deste trabalho e que por um lapso no momento não me lembrei de citar.

E finalmente, aos tantos camundongos que foram sacrificados para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Ítems	Páginas
-RESUMO -----	i
1 -INTRODUÇÃO-----	01
2 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	05
2.1. O endométrio na implantação-----	05
2.2. O trofoblasto e suas variações morfológicas-----	07
2.3. Morfologia e função das células trofoblásticas gigantes (CTGs)-----	09
2.4. Catepsinas -----	14
3 -OBJETIVOS-----	19
4 -MATERIAIS E MÉTODOS-----	20
4.1. Animais-----	20
4.2. Coleta e Fixação-----	20
4.3. Processamento-----	21
4.3.1. Inclusão em parafina-----	21
4.3.2. Embebição e congelação em composto OCT para criocortes-----	22
4.3.3. Inclusão em resina epoxi-----	22
4.3.4. Inclusão em resina LR-White-----	23
4.4. Reação imunoistoquímica-----	24
4.4.1. Imunofluorescência em cortes de congelação-----	24
4.4.2. Imunoperoxidase em cortes de congelação-----	25
4.4.3. Imunoperoxidase em cortes de parafina-----	25
4.4.4. Imunofluorescência em cortes de parafina-----	26
4.4.5. Controles-----	26
4.5. Procedimentos para imunomarcação a nível ultra-estrutural-----	27

4.6. Processamento imunoquímico-----	27
4.6.1. Obtenção de homogeneizados-----	27
4.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS em mini placa vertical-----	28
4.6.3. Transferência para a membrana de nitrocelulose-----	29
4.6.4. Reação imunoquímica-----	29
5 -RESULTADOS-----	30
5.1. Análise Morfológica-----	30
5.1.1. Descrição morfológica das células trofoblásticas gigantes (CTGs) a nível de microscopia fotônica-----	30
5.1.1.1. oitavo dia de gestação-----	31
5.1.1.2. nono dia de gestação-----	32
5.1.1.3. décimo primeiro dia de gestação-----	33
5.1.1.4. décimo terceiro dia de gestação-----	34
5.1.1.5. décimo quinto dia de gestação-----	35
5.1.1.6. décimo oitavo dia de gestação-----	37
5.1.2. Descrição ultra-estrutural das CTGs-----	38
5.2. Reações Imunoistoquímicas em microscopia fotônica-----	39
5.2.1. Imunofluorescência em criocortes para a anticatepsina D e B-----	39
5.2.2. Imunoperoxidase em cortes de congelação-----	40
5.2.2.1. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D-----	41
5.2.2.2. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B-----	41
5.2.3. Imunoperoxidase em cortes de parafina-----	41
5.2.3.1. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D-----	42
5.2.3.2. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B-----	43

5.2.4. Imunofluorescência em cortes de parafina revelados com o conjugado fluorocromo Cy2-----	44
5.2.4.1. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D-----	44
5.2.4.2. Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B-----	45
5.3. Imunomicroscopia eletrônica-----	47
5.4. “Western-Blotting”-----	48
6 -ILUSTRAÇÕES-----	49
7 -DISCUSSÃO-----	62
8 -CONCLUSÕES-----	73
9 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	74
-ABSTRACT-----	96

RESUMO

Em roedores, as células trofoblásticas gigantes (CTGs) são as células de origem fetal que se interpõem em todo o perímetro da interface do embrião com o tecido materno. Devido à sua localização estratégica e ao seu comportamento invasivo, têm sido consideradas como responsáveis pela implantação do blastocisto e pela placentação. A placenta madura, por sua vez, é constituída em sua porção fetal por três camadas de células de origem trofoblástica: as células do labirinto-trofoblasto, as células do espôncio-trofoblasto e as CTGs. Além da atividade invasiva, tem sido atribuída às CTGs a remoção de células sanguíneas e do estroma uterino através da fagocitose. Várias enzimas proteolíticas capazes de degradar diferentes substratos poderiam estar envolvidas neste processo.

Com o intuito de se estabelecer a presença e a participação de enzimas proteolíticas lisossomais nas atividades invasivas e fagocitárias das CTGs, foram utilizados sítios de implantação e placentas do 8^o ao 18^o dias de gestação (ddg) de camundongos. Foram realizados estudos morfológicos ao nível de microscopia fotônica e eletrônica, assim como estudos imunoquímicos e imunocitoquímicos para detecção de duas proteases lisossomais, as catepsinas D e B.

Os resultados obtidos demonstraram que as CTGs da frente invasiva, em contato com o tecido materno, contêm lisossomas e fagolisossomas que apresentam reações positivas para as catepsinas D e B. Ao nível ultra-estrutural constatou-se que o conteúdo dos fagossomas era predominantemente de células de origem materna em graus variados de degeneração, as quais mostraram-se positivas nas imunomarcações para as catepsinas D e B. Foram ainda observadas imunomarcações para a anticatapsina D nos compartimentos extracelulares das CTGs que continham restos celulares de origem materna. O “western blotting” confirma a presença e a especificidade das imunomarcações para os anticorpos utilizados.

A distribuição das CTGs junto à interface com o tecido materno, durante todo o processo da placentação, sugere o seu importante papel na remodelação do tecido materno para a própria progressão da placentação. As imunomarcações positivas ao nível da microscopia fotônica e eletrônica confirmaram, além da presença destas enzimas lisossomais nestas células, a sua participação na degradação do substrato fagocitado. A constatação da imunom marcação positiva no espaço extracelular para a catepsina D sugere a secreção das enzimas lisossomais pelas CTGs e a sua participação na atividade invasiva.

1 - INTRODUÇÃO

O sucesso da implantação embrionária, em roedores decorre das interações entre o organismo materno e o blastocisto (Finn & Martin, 1974; Finn, 1977; O'Grady & Bell, 1977; Yoshinaga, 1988; Denker, 1990) que devem se encontrar em perfeita sincronia. Este momento que restringe a receptividade uterina à implantação embrionária é definido como janela de implantação. (Yoshinaga, 1988; Rogers & Murphy, 1989; Lea & Clarck, 1991; Yamada, 1993; Yamada & Nagata, 1993). No decorrer da implantação em roedores, o endométrio sofre profundas modificações morfológicas e funcionais, dentre as quais destacam-se a apoptose do epitélio uterino (Parr et al., 1987; Parr & Parr, 1989) e a decidualização do estroma endometrial (DeFeo, 1967; Finn, 1977; Abrahamsohn, 1983; Katz & Abrahamsohn, 1987; Welsh & Enders, 1985; Alberto-Rincon et al., 1989; Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Em camundongos, da diferenciação da trofotoderme que reveste o blastocisto origina-se o trofoblasto e este fixa o blastocisto ao endométrio. As células trofoblásticas gigantes (CTGs) primárias que invadem o endométrio e consolidam a implantação diferenciam-se a partir das células trofoblásticas (Dickson, 1966; Barlow & Sherman, 1972; Gardner et al., 1973; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Kanai-Azuma et al., 1994). Neste processo, estas células, tornam-se hipertróficas, o seu núcleo poliplóide aumenta em dezenas de vezes o seu genoma (Coop, 1979; Ilgren, 1981; Kanai-Azuma et al., 1994) e assumem um comportamento invasivo (Müntener & Hsu, 1977; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Kanai-Azuma et al., 1994). De acordo com Tachi et al. (1970), as CTGs primárias, localizadas na região lateral e abembrionária do blastocisto, são responsáveis pela invasão inicial do endométrio.

A partir das células trofoblásticas do pólo embrionário organiza-se o cone ectoplacentário (CEP) e deste diferenciam-se as CTGs secundárias (Müntener & Hsu, 1977; Coop, 1979; Mehrotra, 1988; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989, 1994; Iwakura, 1989; Hoffmann & Wooding, 1993).

Posteriormente, da proliferação e diferenciação das células do CEP originam-se as demais células trofoblásticas, responsáveis pela organização das camadas do labirinto e do espongio-trofoblasto (Peel & Bulmer, 1976; Müntener & Hsu, 1977; Zuckermann & Head, 1986; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Roby & Soares, 1993; Kanai-Azuma et al., 1994). De acordo com Mehrotra (1988), o CEP de camundongos é constituído por quatro tipos celulares. Aparentemente, as CTGs secundárias diferenciam-se das células localizadas mais periféricamente no CEP (Poots, 1968; Billington, 1971; Peel & Bulmer, 1976; Smith & Wilson, 1974; Mehrotra, 1988).

Fatores tais como TGF-alfa (Haimovici & Anderson, 1993; Hofmann & Wooding, 1993; Horowitz et al., 1993), TGF-beta (Graham et al., 1992; Irving & Lala, 1995) EGF (Haimovici & Anderson, 1993), IGF-I, IGF-II (Kanai-Azuma et al., 1993), PDGF, CSF-1, bFGF (Haimovici & Anderson, 1993) têm sido relatados como atuantes na proliferação ou na diferenciação das células placentárias. Associado diretamente às CTGs temos o IGF-II que parece ser responsável pela diferenciação das células do CEP em CTGs "in vitro" (Kanai-Azuma et al., 1993). No entanto, ainda não se conhecem os mecanismos envolvidos no desencadeamento da organogênese da placenta a partir das células do CEP.

É atribuída às CTGs a busca de suprimento sangüíneo para a manutenção do embrião até que a placenta esteja estabelecida (Welsh & Enders, 1987). Este comportamento associado à atividade invasiva parece ser intrínseco às CTGs, uma vez que tem sido constatado também em experimentos de desenvolvimentos ectópicos (Kirby, 1963; Yamada, 1990; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1991; Faria & Bevilacqua, 1995).

Devido ao seu comportamento invasivo as células trofoblásticas têm sido comparadas às células tumorais (Shukla et al., 1991; Graham & Lala, 1991, 1992). No entanto, a invasão das células trofoblásticas no estroma endometrial difere da metástase, pois é um fenômeno precisamente controlado, enquanto a invasão das células tumorais malignas não pode ser controlada (Graham & Lala, 1991).

Tem sido sugerido que o trofoblasto expresse seu potencial invasivo baseado na produção de enzimas que degradem especificamente a matriz extracelular (Mullins & Hohlrich, 1982; Glass et al., 1983; Blankenship & Given, 1992; Kanai-Azuma et al., 1994). Tais enzimas proteolíticas (do trofoblasto) devem, entre outros, criar condições para que a transposição da membrana basal do epitélio uterino seja facilitada (Blankenship & Given, 1992). Babiartz et al. (1992) sugerem que a inibição de proteinases pode impedir a degradação da matriz decidual pelo trofoblasto.

O potencial invasivo das células tumorais tem sido associado diretamente à presença da catepsina D (Johnson et al., 1993; Isola et al., 1993; Kandalaft et al., 1993; Têtu et al., 1994; Scambia et al., 1994; Schultz et al., 1994), catepsina B (Higashiyama et al., 1993; Inoé et al., 1994; Rozhin et al., 1994; Sukoh et al., 1994 a, b; Spiess et al., 1994) e catepsina L (Castiglioli, et al., 1994; Sukoh et al., 1994b), sugerindo que a liberação das mesmas esteja envolvida neste mecanismo.

Concomitantemente, à atividade invasiva das CTGs no endométrio de roedores, tem sido constatado que a remoção de células sanguíneas e do estroma uterino se deve à fagocitose pelas CTGs tanto na implantação normal (ratos - Schlafke & Enders, 1975; Welsh & Enders, 1991a; camundongos - Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989; *Calomys callosus* - Ferro & Bevilacqua, 1994), quanto em sítios ectópicos (ratos - Fawcett, 1950; Kirby, 1963; camundongos - Yamada, 1990; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1991; *Calomys callosus* - Faria & Bevilacqua, 1995).

Por outro lado, as catepsinas D e B são enzimas proteolíticas lisossomais capazes de degradar “in vitro” e “in vivo” diversos substratos (Burleigh et al., 1973; Etherington, 1973; Mullins & Rohrllich, 1983; Kiyoshima et al., 1993) e podem ser encontradas em diversos tipos celulares. Nos macrófagos que são caracterizados pela sua atividade fagocitária têm sido descritos elevados teores de catepsina B e H. (Kominami et al., 1985; Kiyoshima et al., 1993).

Guilbert et al. (1993) comparam as CTGs aos macrófagos devido às semelhanças na atividade fagocitária, presença de possíveis enzimas

proteolíticas no interior de lisossomas, além da expressão de alguns receptores comuns na membrana.

Desta forma, as enzimas da categoria das catepsinas poderiam estar presentes nas CTGs e relacionadas tanto na atividade invasiva à semelhança das células tumorais, quanto na atividade fagocitária, à semelhança dos macrófagos.

No presente trabalho, foi analisada a presença das catepsinas D e B nas células trofoblásticas, através de determinações imunoquímicas e imunocitoquímicas ao nível da microscopia fotônica e eletrônica. O estudo enfocou as CTGs de camundongos em diferentes estádios e localizações, com o objetivo de correlacionar estas enzimas lisossomais à atividade invasivo-fagocitária no período pré-placentário e de placentação.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A despeito do desenvolvimento tecnológico atingido na área de biologia da reprodução, o binômio materno-fetal e a sua interação ainda são imprescindíveis para o sucesso da concepção em espécies de animais placentados. Esta interação é uma sequência complexa de fenômenos onde alguns dos mecanismos envolvidos já têm sido elucidados através de estudos em animais de laboratório. Visando facilitar a compreensão da participação das células trofoblásticas, serão descritos a seguir os principais aspectos conhecidos sobre o comportamento destas células na interação com o organismo materno em camundongos. Estes conhecimentos foram, quando necessários, complementados com dados específicos obtidos em outros animais de placentação hemocorial.

2.1 - O endométrio na implantação

O sucesso da implantação em roedores decorre de uma íntima e ativa associação entre o organismo materno e tecidos de origem embrionária (Finn & Martin, 1974; Finn, 1977; O'Grady & Bell, 1977; Denker, 1990; Enders & Welsh, 1993; Ferro & Bevilacqua, 1994). Segundo Mossman (1937), esta interação em camundongos pode ser visualizada por volta do 5º dia de gestação (ddg) na câmara de implantação localizada na região antimesometrial.

Em roedores, o processo de implantação em ratas foi descrito em detalhes por Schlafke & Enders (1975), como sendo constituído por três fases bem definidas: a aposição do blastocisto no epitélio uterino, a adesão do trofoblasto à superfície do epitélio e a invasão do trofoblasto no estroma uterino. Para camundongos, Smith & Wilson (1974), além das fases da sequência acima, descrevem três fases anteriores que seriam as de pré-aposição

envolvendo as mudanças ocorridas na zona pelúcida e a sua perda.

A implantação, além de promover a fixação do blastocisto na mucosa uterina, proporcionaria ao embrião um meio eficiente para realizar trocas metabólicas com o organismo materno no período que antecede a placentação. (Welsh & Enders, 1987).

Para que a implantação seja viável, o endométrio e o blastocisto precisam estar em perfeita sincronia determinando um momento denominado de janela de implantação (Yoshinaga, 1988; Rogers & Murphy, 1989; Lea & Clarck, 1991; Yamada & Nagata, 1993). Isto é, a receptividade do endométrio para a implantação do embrião seria ativada sob influência dos hormônios ovarianos (Yoshinaga, 1988; Denker, 1990). Esta receptividade seria, ainda, um fenômeno topológico e cronologicamente definido do endométrio durante o período perimplantacional (Yamada, 1993; Yamada & Nagata, 1993).

No decorrer da implantação em roedores, o endométrio sofre profundas modificações morfológicas e funcionais, dentre as quais destaca-se a remoção do epitélio uterino em consequência da morte celular por apoptose (Parr et al., 1987; Parr & Parr, 1989; Welsh & Enders, 1991a). Concomitantemente inicia-se a decidualização do estroma endometrial, a qual consiste em um conjunto de transformações morfológicas e fisiológicas do estroma endometrial desta região, formando um novo tipo de tecido, a decídua (DeFeo, 1967; Finn, 1977; Abrahamsohn, 1983; Welsh & Enders, 1985; Alberto-Rincon et al., 1989; Abrahamsohn & Zorn, 1993).

A decídua é de fundamental importância, uma vez que permite, além da ancoragem segura dos blastocistos no endométrio (DeFeo, 1967; Finn, 1977; Abrahamsohn, 1983), também a nutrição do embrião nos estágios iniciais (Billington, 1971; Katz, 1995) e a formação de uma barreira mecânica capaz de conter a atividade invasiva das CTGs (Kirby, 1963; DeFeo, 1967; Billington, 1971). A este tecido tem sido atribuída, ainda, a síntese de substâncias, tais como fatores de crescimento (Lysiak et al., 1993) e fatores imunossupressores (Weitlauf, 1988).

2.2 - O trofoblasto e suas variações morfológicas

De acordo com Dickson (1966), o blastocisto de camundongos apresenta uma massa celular embrioblástica formando o pólo embrionário e uma cavidade, a blastocèle. Ambas são revestidas externamente pelas células trofoblásticas originárias da diferenciação da trofocotoderme, sendo que todo o perímetro da blastocèle também é conhecido como região mural do blastocisto.

O trofoblasto é, portanto, o tecido de origem embrionária que se localiza entre o embrião e o tecido materno, estabelecendo a fronteira que perdura durante todo o período da gravidez. Esta íntima associação entre os tecidos maternos e fetais é atribuída principalmente às CTGs por serem estas as células que constituem a interface materno-fetal ao longo de todo o embrião e da placenta fetal. Portanto, as CTGs desempenham importante papel na remodelação tecidual e nas interações materno-fetais (Azuma et al., 1991; Kanai-Azuma et al., 1994).

As células trofoblásticas da região mural proliferam e diferenciam-se originando as CTGs ditas primárias (Dickson, 1966; Barlow & Sherman, 1972; Gardner et al., 1973; Copp, 1978, 1979; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988). Em camundongos, são estas CTGs primárias que estabelecem contato com as células maternas, sendo responsáveis pela invasão do endométrio para a fixação do blastocisto (Poots, 1968; Tachi et al., 1970, Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989). As CTGs primárias estão localizadas ao longo do perímetro do embrião e entram em contato com o estroma endometrial, atingem o leito vascular materno formando uma série de espaços para a circulação de sangue materno (Dickson, 1966; Barlow & Sherman, 1972; Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Enders & Welsh, 1993; Hoffman & Wooding, 1993). Portanto, as CTGs são responsáveis por consolidar a implantação do blastocisto através da sua capacidade invasiva (Fawcett, 1950; Kirby, 1963; Billington, 1971; Schalafke & Enders, 1975; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988).

A partir das células trofoblásticas localizadas no pólo embrionário do blastocisto, forma-se o cone ectoplacentário (CEP) (Peel & Bulmer, 1976; Müntener & Hsu, 1977; Coop, 1979; Mehrotra, 1988; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989; Enders & Welsh, 1993; Hoffman & Wooding, 1993; Kanai-Azuma et al., 1994). Em camundongos, esta estrutura organiza-se ao redor do 6º dia de gestação, e das células trofoblásticas que delimitam o seu perímetro externo, diferenciam-se as CTGs secundárias (Peel & Bulmer, 1976; Müntener & Hsu, 1977; Mehrotra, 1988; Hoffman & Wooding, 1993; Kanai-Azuma et al., 1994).

À semelhança das CTGs primárias localizadas na região mural do blastocisto e que interagem com o estroma uterino da região antimesometrial, as CTGs secundárias localizadas perifericamente ao CEP interagem e invadem o estroma uterino da região mesometrial (Coop, 1979). As CTGs primárias e secundárias apesar de serem semelhantes fenotipicamente (Varnuza et al., 1988) apresentam diferenças na expressão de antígenos de histocompatibilidade (Carther, 1978).

As demais células do CEP se diferenciam para a formação das outras camadas placentárias, isto é, as camadas do labirinto-trofoblasto e do espôngio-trofoblasto (Peel & Bulmer, 1976; Müntener & Hsu, 1977; Coop, 1979; Zuckermann & Head, 1986; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Roby & Soares, 1993; Kanai-Azuma et al., 1994). A diferenciação das células do CEP vão constituir mais de 70% das células placentárias (Rossant & Croy, 1985). As CTGs mantêm-se no perímetro externo da placenta e o seu número mantêm-se praticamente constante pelo cessamento da sua proliferação ao redor do 13º dia de gestação, ocorrendo apenas o crescimento do volume celular (Müntener & Hsu, 1977).

Não se conhecem os mecanismos precisos envolvidos na diferenciação das células do CEP (Zuckermann & Head, 1986), porém, a expressão de alguns fatores de crescimento parece influenciar na proliferação ou na diferenciação das células placentárias. O TGF-alfa é detectado na interface materno-fetal durante toda a gestação e parece ser importante para o crescimento da placenta

humana (Lysiak et al., 1993). De acordo com Hofmann et al. (1993), e Horowitz et al. (1993), este fator de crescimento está presente na membrana plasmática das células trofoblásticas invasivas humanas e deve estar relacionado com um controle autócrino/paracrino através de interações com o EGF. O TGF-beta reduz a migração trofoblástica humana (Graham et al., 1992; Irving & Lala, 1995), o IGF-II e o IGFBP-1 estimulam a migração trofoblástica também na espécie humana (Irving & Lala, 1995). Em camundongos, Hainovici & Anderson (1993) observaram o efeito de alguns fatores de crescimento “in vitro” e demonstraram que o EGF, TGF-alfa, PDGF, CSF-1 e bFGF podem promover o crescimento do trofoblasto e têm importante papel no estabelecimento da gestação. De acordo com Kanai-Azuma et al. (1993), o IGF-I parece induzir a proliferação das células do CEP de camundongos e o IGF-II induz a diferenciação destas células em CTGs “in vitro”.

A placenta madura é constituída em sua maior parte pela camada labiríntica (Müntener & Hsu, 1977). Em ratas, esta camada forma a barreira placentária onde o sangue fetal e o materno são separados por três camadas de células de origem trofoblástica, além do endotélio dos vasos sanguíneos fetais (Enders, 1965; Kirby & Bradbury, 1965). Uma camada compacta formada por células do espôngio-trofoblasto interpõe-se entre as CTGs e o labirinto. Esta camada seria atravessada somente por vasos maternos e juntamente com as CTGs e as células de glicogênio formam a zona juncional que justapõe-se à decidua materna (Peel & Bulmer, 1976; Jollie & Craig, 1979; Roby & Soares, 1993).

2.3 - Morfologia e função das células trofoblásticas gigantes (CTGs)

As CTGs plenamente diferenciadas caracterizam-se pela sua hipertrofia, acompanhada do aumento do volume nuclear decorrente de endomitoses e conseqüente aumento do conteúdo genômico (Barlow & Sherman, 1972; Ilgren,

1981, 1983; Kanai-Azuma et al., 1994). Apresentam ainda como característica morfológica a basofilia citoplasmática e a presença de grânulos ou vesículas de conteúdo heterogêneo (Bulmer & Dickson, 1960). Esta célula caracteriza-se por possuir o núcleo bastante irregular devido a inúmeras invaginações do seu envoltório (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988), podendo conter inclusões intranucleares (Jollie & Craig, 1979) e os nucléolos freqüentemente são múltiplos (Jollie & Craig, 1979; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988).

Quanto ao aspecto ultra-estrutural as principais características são: presença de grande quantidade de polissomas e ribossomas livres, o retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi desenvolvido, muitas mitocôndrias com projeções da membrana interna tubulares ou em cristas, lisossomas primários e secundários estão presentes em grande quantidade, além de um conteúdo heterogêneo de grânulos e vesículas (Jollie & Craig, 1979; Jollie, 1981; Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Hoffman & Wooding, 1993). De acordo com Bevilacqua & Abrahamsohn (1988), uma grande quantidade de fagossomas contendo células sangüíneas e fragmentos de células uterinas em vários estágios de degeneração pode ser encontrada no interior citoplasmático das CTGs. De acordo com Jollie & Craig (1979) são encontrados, também, corpos residuais e, às vezes, glicogênio no interior citoplasmático. Welsh & Enders (1987) e Bevilacqua & Abrahamsohn (1988) descrevem a presença de grandes gotículas de lipídios distribuídas pelo citoplasma. Têm sido observados, na matriz citoplasmáticas, feixes de filamentos intermediários (Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988) que segundo Zuckermam & Head (1986) são constituídos de citoqueratinas.

O contorno irregular das CTGs decorre dos seus inúmeros prolongamentos citoplasmáticos que freqüentemente unem-se às CTGs adjacentes (Bevilacqua & Abrahamshon, 1988, 1989, 1994). Ao nível ultra-estrutural, na superfície celular são constatadas microvilosidades irregulares e nas áreas de contato entre os prolongamentos citoplasmáticos, as junções do tipo desmossomas (Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988)

e também do tipo nexos (Hoffman & Wooding, 1993).

Na implantação normal, são encontrados prolongamentos citoplasmáticos das CTGs penetrando entre a lâmina basal e as células epiteliais (Tachi et al., 1970; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989). De acordo com Blankenship & Given (1992), a penetração da membrana basal é imprescindível para que as CTGs entrem em contato com o estroma endometrial. Este processo invasivo é bastante semelhante ao descrito por Liota et al. (1986) para as células tumorais. As barreiras teciduais que as células tumorais atravessam para se disseminarem seriam similares às que o trofoblasto transpõe para que a implantação e a placentação se consolidem (Graham & Lala, 1992). Portanto, a célula trofoblástica tem sido comparada às células cancerígenas no tocante à sua atividade invasiva (Shukla et al., 1991; Graham & Lala, 1991, 1992). Contudo, a atividade invasiva das CTGs no estroma endometrial parece ter um controle preciso neste ambiente, o que não ocorre com as células tumorais malignas em geral (Graham & Lala, 1991, 1992).

Uma vez atingido o estroma endometrial, as CTGs penetrariam entre as células endoteliais atingindo os vasos sangüíneos (Welsh & Enders, 1985), possibilitando ao embrião o acesso ao sangue materno (Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1994). Ao atingir os vasos, estas células penetrariam em seu interior e passariam a revesti-los destituindo as células endoteliais. Este processo ocasionaria o extravasamento sangüíneo para o interior da rede de lacunas formadas pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs (Welsh & Enders, 1985). A exposição do sangue materno junto às células trofoblásticas seria essencial para ocorrer as trocas metabólicas necessárias ao embrião (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988), pois é o sangue materno que assegura o suprimento nutricional adequado para o desenvolvimento deste (Welsh & Enders, 1987). O comportamento hematotrófico das CTGs parece direcionar a atividade invasiva destas células, tanto nas fases iniciais da implantação na região antimesometrial, quanto na organogênese da placenta na região mesometrial.

O comportamento invasivo das CTGs tem sido melhor compreendido em desenvolvimentos ectópicos. Nestes experimentos, verificou-se a exacerbação da capacidade invasiva das CTGs com formação de extensas áreas hemorrágicas nos órgãos receptores (Fawcett, 1950; Kirby, 1963; Yamada, 1990; Bevilacqua & Abrahamshon, 1991; Faria & Bevilacqua, 1995). De acordo com Bevilacqua & Abrahamshon (1991), o desenvolvimento do trofoblasto enxertado na pele é bem sucedido, se as CTGs conseguem alcançar o leito vascular local. Os experimentos de desenvolvimento ectópico permitem estabelecer o determinismo funcional das CTGs e atribuir, indiretamente, o importante papel da decídua no controle da invasão trofoblástica.

Desta forma, o fenômeno da transdiferenciação das células endometriais em deciduais teriam um papel fundamental no controle da invasão nas CTGs, pela constituição de uma barreira mecano-física eficiente (Kirby, 1963, Lala et al., 1990; Babiarez et al., 1992). Além disso, as células deciduais têm a capacidade de expressar algumas moléculas que inibiriam a invasão trofoblástica, tais como, o TGF-beta e TIMP-1 (Graham & Lala, 1991), sendo provavelmente o TGF-beta a chave do controle da invasão trofoblástica humana (Graham & Lala, 1991; Graham et al., 1992).

Concomitantemente à atividade invasiva das CTGs as células do endométrio sofrem um processo de degeneração (Welsh & Enders, 1991a, b; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988). Morfologicamente, a remoção das células sangüíneas e do estroma uterino próximos às CTGs parece ocorrer através da fagocitose exercida pelas próprias CTGs (Welsh & Enders, 1987, 1991a; Katz & Abrahamsohn, 1987; Enders & Welsh, 1993; Ferro & Bevilacqua, 1994; Katz, 1995). A atividade de eritrofagocitose das CTGs foi demonstrada “in vitro” por Albieri & Bevilacqua (1996) através de uma estimulação feita com acetato de forbol miristrato (PMA) e retinal.

Desta forma, têm sido atribuídas às CTGs como sendo o seu determinismo funcional, tanto a atividade invasiva em direção ao estroma endometrial, quanto a atividade fagocitária. Na implantação normal, tal determinismo funcional permite ao conceito atingir o suprimento sangüíneo

adequado para sua manutenção durante o período pré-placentário (Welsh & Enders, 1987).

Tanto o caráter invasivo quanto a fagocitose, devem envolver a ação de enzimas proteolíticas capazes de degradar diferentes substratos (Strickiland et al. 1976; Mullins & Hohlrich, 1982; Glass et al., 1983; Barbiarz et al., 1992; Blankenship & Given, 1992; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1994; Kanai-Azuma et al., 1994, Katz, 1995).

Katz (1995) constatou a presença da fosfatase ácida no meio extra celular das CTGs, sugerindo que estas células possam liberar a enzima para a degradação do colágeno. Da mesma forma, a atividade fagocitária requer um aparato lisossômico e mecanismo de endocitose aprimorado por parte das CTGs.

Estudos ultra-estruturais têm demonstrado fagossomas contendo no seu interior restos celulares em vários estágios de degeneração, sugerindo uma efetiva digestão intracelular (Welsh & Enders, 1987, 1991a; Tachi et al., 1970; Katz & Abrahamsohn, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989). No entanto, não há trabalhos que relacionem as eventuais enzimas líticas envolvidas neste processo. Hamilton et al. (1991) evidenciaram a presença da catepsina L no interior das CTGs e das células do espôncio-trofoblasto, no entanto, não estabeleceram uma correlação que permita definir a exata participação desta enzima no processo fagocitário e/ou invasivo. Neste sentido, estudos pormenorizados da natureza lisossômica das vesículas intracitoplasmáticas das CTGs permanecem por ser estabelecidos.

Além das atividades de invasão e fagocitose, têm sido atribuídas funções imunoprotetoras às células trofoblásticas, impedindo que agentes infecciosos passem do organismo materno para o fetal (Simmons & Russel, 1962; Guilbert et al., 1993). Guilbert et al. (1993) comparam as células trofoblásticas aos macrófagos e/ou aos linfócitos T devido às semelhanças quanto à sua pontencialidade fagocitária, invasiva, de sincicialização, à expressão de marcadores linfocitários CD4, CD14, por apresentar receptores de IgG (Fcr), macrófago granulócito-CSF (GM-CSF), fator 1 de estimulação colonial (CSF-

1), interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral (TNF-alfa), fatores de transformação e crescimento (TGF), receptores para estas citocinas e não apresentarem esterases específicas. Os autores acima sugerem, ainda, que estas células façam parte da rede do sistema mononuclear fagocitário do organismo.

Por outro lado, as CTGs apresentam funções endócrinas que seriam essenciais para a manutenção da gravidez. Dentre os produtos de secreção comprovada constam a progesterona (Sherman, 1983), a prolactina (Soares et al., 1993; Soares et al., 1996) e o lactogênio (Soares et al., 1985; Soares & Glasser, 1987; Nieder & Jennes, 1990; Kanai-Azuma et al., 1994; Soares et al., 1996). Segundo Soares et al. (1993), o processo de diferenciação celular das CTGs compreende ainda a expressão da capacidade secretora por parte destas células. Aparentemente, após um determinado momento do desenvolvimento placentário, as CTGs cessam seu comportamento invasivo e passam a desempenhar um papel endócrino (Kanai-Azuma et al., 1994).

2.4- Catepsinas

Estudos bioquímicos têm demonstrado a heterogeneidade de conteúdo enzimático em lisossomas e conseqüentemente diferenças na sua atividade funcional (Groh & Mayersbach, 1981). Dentre as enzimas proteolíticas encontram-se as catepsinas que são capazes de degradar vários substratos "in vivo" e "in vitro" (Burleigh et al., 1973; Etherington, 1973; Mullins & Rohrllich, 1982; Kiyoshima et al., 1993), tais como colágeno e proteínas miofibrilares (Bando et al., 1986; Kügler & Vornberger, 1986). Por esta razão, estas enzimas são associadas à capacidade fagocitária de células tais como: macrófagos (Kiyoshima et al., 1993; Johnson et al., 1993) e osteoclastos (Baron, 1989; Goto et al., 1993, 1994).

As catepsinas são enzimas lisossomais e estão classificadas na sua grande maioria entre as cisteilproteínases (B, C, H, L, S) (Uchiyama et al., 1994; Petanceska et al., 1994) e aspartilproteínases (D e E) (Nakanishi et al.,

1994; Kageyama et al., 1996).

As catepsinas B, H e L são sintetizadas como pré-pró-enzimas no retículo endoplasmático granular e modificadas no interior desta organela. As pró-enzimas são encontradas no interior das cisternas do complexo de Golgi, enquanto nos lisossomas são encontradas suas formas ativas. Assim, foi sugerido que a ativação destas enzimas ocorra na rede de tráfego entre o “Trans-Golgi Network” e os lisossomas, ou em lisossomas pós-transporte (Uchiyama et al., 1994). Segundo estes autores, a molécula da catepsina B possui como formas ativas os pesos moleculares de 29 e 26 kD e sua pró-enzima com 39 kD, enquanto a pró-catepsina L apresenta 39 kD como pró forma e 29 e 22 kD como formas ativas. Algumas vezes estas enzimas podem ser secretadas na forma de pró-enzima e a catepsina D, uma aspartilproteinase, pode estar associada na conversão destas formas em enzimas ativas no meio extracelular (Uchiyama et al., 1994).

A catepsina D também é uma proteína sintetizada no retículo endoplasmático granular (Erickson & Blobel, 1979, Rosenfeld et al., 1982, Gieselmann et al., 1985) como as catepsinas pertencentes ao grupo das cisteilproteases. Esta enzima chega aos lisossomos em sua forma pré e é ativada no interior dessas organelas (Hasilik & Neufeld, 1980). O peso molecular da catepsina D madura, assim como das demais catepsinas, varia de acordo com a espécie: 45 kD no porco (Larsen et al., 1993) e no rato (Yokota, S. - informação pessoal), 47 kD no homem (Gieselmann et al., 1985). A maturação da catepsina D é estimulada pelo ciclo do ATP e pela acidificação lisossômica, necessitando provavelmente da ação das cisteinoproteinases (Gieselmann et al., 1985).

Várias catepsinas têm sido identificadas em diferentes órgãos de mamíferos (Woessner & Brewer, 1963; Etherington, 1972; Burleigh et al., 1974; Elangovan & Moulton, 1980; Yokota & Atsumi, 1983; Kominami et al., 1985; Yokota et al., 1985 a, b; 1986 a, b, c; Bando et al., 1986; Kügler & Vorberger, 1986; Yokota & Kato, 1988; Waguri et al., 1990; Kominami et al., 1991; Kawabata et al., 1993; Matsuishi et al., 1992; Punnonen et al., 1992; Go

to et al., 1993, 1994; Metayé et al., 1993; Sano et al., 1993; Nakanishi, et al. 1994; Petanceska et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Araki, et al., 1995; Burnett et al., 1995; Igddoura et al., 1995; Bergquist et al., 1996). Bando, et al., (1986) analisaram bioquimicamente a presença de catepsinas L, B e H em diversos tecidos de ratos, e constataram variações quantitativas e qualitativas destas enzimas em lisossomas. No fígado, ocorre diversidade na população lisossômica de um mesmo hepatócito e também entre hepatócitos de diferentes regiões do lóbulo hepático (Kominami et al., 1985; Yokota et al., 1985b; Li et al., 1985; Bando et al., 1986).

As catepsinas D, L, B, e H têm sido demonstradas através de métodos imunocitoquímicos, em células dos túbulos renais (Yokota et al., 1985a, 1986a, b; Yokota & Kato, 1988). Nestas células foi confirmada a heterogeneidade no conteúdo enzimático dos lisossomas dos diferentes segmentos dos túbulos renais. Nos macrófagos de ratos, as concentrações das catepsinas B e H são 5 vezes superiores à da catepsina L, sendo que, com a presença do caseinato de sódio, aumenta substancialmente a atividade da catepsina B em relação à catepsina L (Bando, et al., 1986).

As diferenças e a variação na expressão das catepsinas entre as células podem ser atribuídas ao substrato que cada célula degrada (Groh & Mayersbach, 1981; Kominami et al., 1985; Bando et al., 1986; Goto et al., 1993, Uchiyama et al., 1991, 1994; Igddoura et al., 1995) e serão reguladas de acordo com a diferenciação e a especialização celular (Uchiyama et al., 1994). Se por um lado essas enzimas possuem uma grande ubiquidade nos tecidos, por outro lado acredita-se que elas tenham baixa especificidade (Uchiyama et al., 1994).

Concentrações elevadas de catepsinas B e H foram encontradas nos macrófagos. Estas enzimas devem estar relacionadas à atividade fagocitária destas células (Kominami et al., 1985; Kiyoshima et al., 1993), assim como a de outras células fagocitárias profissionais, como os osteoclastos (Baron, 1989; Goto et al., 1993 e 1994).

Estudos recentes associam a secreção de catepsinas ao processo invasivo e metastático de células tumorais. A catepsina B está diretamente envolvida com a metástase e o caráter invasivo do câncer de pulmão (Higashiyama et al., 1993; Sukoh et al., 1994 a, b) e de ovário (Scambia et al., 1994). Para a catepsina D, existem algumas controvérsias. Têtu et al. (1993) estabelecem que estas catepsinas seriam secretadas pelas células do estroma em torno do tumor e não pelas células tumorais, porém esta enzima participaria diretamente da atividade invasiva e metastática do tumor. De acordo com Kandalaft et al. (1993) e Schultz et al. (1994), a catepsina D seria secretada pelas células tumorais de mama e diretamente associada a altos índices metastáticos. Scambia et al. (1994) demonstraram que a secreção de catepsina D também ocorre nas células cancerígenas de ovário e teriam influencia no estabelecimento e na expansão do tumor. Entretanto, os dados de Johnson et al. (1993) e de Isola et al. (1993), demonstraram que o aumento da catepsina D não teria uma relação direta com a capacidade invasiva e metastática das células tumorais de mama. Por sua vez, Castiglioni et al. (1994) contestam a relação entre a presença das catepsinas D, B e L com a agressividade tumoral em mamas.

O papel das catepsinas no processo de invasão tumoral tem sido atribuído em grande parte à ação proteolítica na degradação da membrana basal e da matriz extracelular, através da secreção da catepsina B (Higashiyama et al., 1993; Inoué et al., 1994; Rozhin et al., 1994; Spiess et al., 1994; Sukoh et al., 1994 a e b) da catepsina D (Isola et al., 1993; Kandalaft et al., 1993; Têtu et al. 1993; Schultz et al. 1994) e da catepsina L (Castiglioni et al., 1994; Sukoh et al., 1994b). De acordo com Sukoh et al. (1994b), a membrana basal funciona como uma barreira contra a invasão e metástase tumoral, e a catepsina B podendo digerir os principais componentes desta membrana, tais como laminina, colágeno IV e proteoglicanas, estaria diretamente associada à atividade invasiva e a capacidade metastática de alguns tumores.

Hamilton et al. (1991) observaram a presença de duas formas ativas da catepsina L (29 e 20 kD) e uma pró-forma (39 kD) nas CTGs e nas células do

espôncio-trofoblasto em camundongos. Segundo estes autores, foram detectados dois picos de catepsina L, onde o primeiro coincidia com o início da placentação e o segundo, próximo do parto quando esta enzima poderia estar envolvida na degradação do tecido materno. O fato de ter sido identificado o mRNA correspondente à catepsina L nas CTGs, permitiu estabelecer que a catepsina L possa ser sintetizada nestas células. Estes autores sugeriram ainda que a pró-catepsina L seria sintetizada e liberada para o meio extracelular pelas CTGs, podendo estar associada à atividade fagocitária e migratória destas células.

Assim sendo, é plausível supor que outras enzimas proteolíticas lisossomais da categoria das catepsinas estejam presentes nas CTGs de camundongos, e que a ação destas enzimas estejam envolvidas nas suas atividades invasivas e/ou fagocitárias.

3 - OBJETIVOS

Os objetivos estabelecidos para o presente trabalho são:

- Estabelecer o padrão morfológico das células trofoblásticas gigantes (CTGs) e as formas de interação na interface com o tecido materno durante o período pré-placentário e na placentação de camundongos.
 - Identificar através de métodos imunocitoquímicos ao nível da microscopia fotônica e eletrônica, a presença das enzimas catepsina D e B em CTGs.
 - Estabelecer uma correlação morfo-funcional quanto à participação das catepsinas D e B nas atividades invasiva e fagocitária das CTGs.
-

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, virgens, com idade entre 12 e 16 semanas e machos adultos jovens da mesma linhagem, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os machos foram mantidos em gaiolas individuais, nas quais foram distribuídas 3 ou 4 fêmeas (em cada gaiola) para o acasalamento. Pela manhã, se constatada a presença do tampão vaginal, as fêmeas eram consideradas como prenhes no primeiro dia de gestação (ddg) sendo devidamente identificadas. Os animais foram alimentados com ração comercial e livre acesso à água.

Foram utilizados, também, 2 ratos Wistar machos, adultos, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP.

4.2 - Coleta e fixação

Os animais foram sacrificados no 8º, 9º, 11º, 13º, 15º e 18º ddg para coleta dos respectivos sítios de implantação embrionários ou das placentas. A anestesia foi feita através de 0,33g/kg de hidrato de cloral injetado intraperitonealmente ou por inalação de vapores de éter etílico. Após a laparotomia, e uma vez constatada a presença de embriões implantados ao longo dos cornos uterinos, foi aberta a cavidade torácica para acessar o coração. Em seguida, foi perfundido de 30 a 40 ml da solução fixadora através do ventrículo esquerdo durante 15 minutos. As soluções fixadoras utilizadas foram:

- Paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma-St.Louis/EUA, cod. P6148) dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M pH 7.4 contendo 0,1M de sacarose, para

materiais destinados aos processamentos de inclusão em parafina ou em composto OCT (Tissue-tek).

- PFA 4% e glutaraldeído (GTA) 0,2% (Ladd Research Industries INC) em PBS 0,1M pH 7.4 contendo 0,1M de sacarose, para inclusão em resina LR-white (Sigma-St.Louis/EUA, kit 2770).

- GTA 2,5% em PBS 0,1M pH 7,4 contendo 0,1M de sacarose, para inclusão em resina epóxi.

Foram coletados materiais de pelo menos três sítios de implantação de três animais diferentes para cada ddg estudado.

Após a perfusão, o útero foi removido da cavidade abdominal e o material foi seccionado da seguinte maneira: os sítios de implantação de 8º e 9º dias foram seccionados transversalmente na região mediana; nos sítios de implantação de 11º e 13º dias, foi removido o perimétrio antes da clivagem no sentido transversal. A partir do 15º dia isolaram-se os botões placentários, destituindo-os do perimétrio e recortando transversalmente os botões em fatias de 2 a 3 mm de espessura. Esses espécimes permaneceram imersos, por mais uma hora, na mesma solução fixadora utilizada na perfusão.

4.3 - Processamento

4.3.1- Inclusão em parafina

Os espécimes recortados e mantidos imersos na solução fixadora (PFA 4% em PBS 0,1M) foram lavados em PBS 0,02M pH 7,4, desidratados em gradientes crescentes de concentração de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina contendo DMSO (Histosec - Merck), de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes de 6µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e coletados em lâminas histológicas revestidas com poli-L-lisina a 1% (Sigma-St.Louis/EUA, cod. P8920).

Estes cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e utilizados inicialmente para estudo morfológico da placenta a nível de microscopia fotônica, visando uma melhor compreensão do modelo biológico em estudo e posteriormente para reações imunoistoquímicas.

4.3.2 - Embebição e congelação em composto OCT para criocortes

Os espécimes coletados após perfusão foram lavados em PBS 0,02 M pH 7,4, tratados com glicina 0,1M (Merck) por uma hora, e submetidos ao tratamento crioprotetor com concentrações crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%). Para congelação, os espécimes foram embebidos em composto OCT (Tissue Tek) e mergulhados em n-hexano/N₂. Os blocos contendo os espécimes congelados foram armazenados em “freezer” à temperatura de -20°C até o momento da criotomia. Os criocortes com 5 ou 6µm de espessura foram obtidos em criostato (Minotome-IEC), coletados em lâminas gelatinizadas e secos ao ar.

Foram coletados, também, espécimes a fresco, sem fixação, que foram imediatamente congelados em n-hexano/N₂. Quando tomado este procedimento, os criocortes foram pós-fixados em acetona (p.a.acs. - Cinética Química Ltda) ou metanol (p.a.acs. - Química Moura Brasil) à temperatura de -20°C.

Os criocortes obtidos de acordo com os processamentos acima foram destinados para reações imunoistoquímicas.

4.3.3 - Inclusão em resina epóxi (Epon 812)

Os fragmentos fixados foram lavados em PBS 0,02M pH 7,4, pós fixados com tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora em temperatura ambiente, lavados em PBS 0,02M e tratados com acetato de uranila a 0,5% (Merck) por 12 horas. A desidratação foi conduzida conforme a técnica rotineira para

inclusão em resina Epon (Poli/Bed 812 - Poliscience/EUA). A polimerização foi conduzida a 60° C por 48 horas.

Os cortes semifinos foram obtidos em ultramicrotomo Porter Blum MT2 ou MT1 (Sorvall) e após corados com azul de toluidina 0,5% (Merck), foram analisados a nível de microscopia fotônica. Após delimitação das áreas de interesse, os cortes ultrafinos de coloração cinza-prateado, obtidos no ultramicrotomo Porter Blum MT2 (Sorvall), foram coletados em telas de cobre de 150 “mesh” e contrastados com acetato de uranila 1% (Merck) e citrato de chumbo de Reynolds. As observações foram feitas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-9S (60kV), Philips EM 400 (60kV) ou JEOL 100 CX II.

4.3.4 - Inclusão em resina LR-White

Os materiais fixados em PFA 4% e GTA 0,2%, dissolvidos em PBS 0,1M pH 7,4 contendo 0,1M de sacarose, foram lavados em PBS 0,02M pH 7,4 (3x 10 minutos) e tratados com solução de lisina 0,1M ou de glicina 0,1M por 1 hora. A desidratação foi feita em concentrações crescentes de N-N-dimetilformamida (50%, 70%, 80%, 90% e 100%) durante 30 minutos cada. Os fragmentos foram embebidos em misturas de N-N-dimetilformamida e resina LR-White (Medium Grade - London Resin ou Hard Grade - SIGMA - St. Louis/EUA kit 27.70) nas proporções de 1:1 e 1:2 durante 1 hora cada, para posterior embebição na resina LR-White pura durante 12 horas. A inclusão foi feita em cápsulas “BEEM” de fundo chato preenchidas com LR-White e a polimerização foi induzida com luz ultravioleta a -20°C, por 48 horas.

Cortes semifinos de 0,5µm foram obtidos em ultramicrotomo Porter Blum MT-2 (Sorvall) e foram coletados em lâminas histológicas. Os cortes ultrafinos de coloração amarelo-dourada foram coletados em telas de níquel de 200 ou 150 “mesh” e destinados às reações imunocitoquímicas.

4.4 - Reações imunoistoquímicas

Cortes de congelação e de parafina foram submetidos à técnica de reações imunoistoquímicas, utilizando-se anticorpos policlonais, anticatepsina D (45 kD) e anticatepsina B (24 kD), obtidos em coelho. Estes anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sadaki Yokota do "Department of Anatomy, Yamanashi School of Medicine, Japan".

4.4.1- Imunofluorescência em cortes de congelação

As lâminas contendo os criocortes foram lavadas em PBS 0,02M pH 7,4 por 3 vezes de 10 minutos. O tratamento de bloqueio, anterior à incubação do anticorpo primário, foi realizado com PBS 0,1M pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) (tipo V - Sigma-St.Louis/EUA cod. A2153) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários diluídos em PBS/BSA foram incubados de 12 a 14 horas em câmara úmida à temperatura de 0 a 4 °C. A anticatepsina D foi utilizada na diluição 1:500 e a anticatepsina B 1:250.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS 0,02M e o anticorpo secundário utilizado foi o de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Sigma - St. Louis/EUA cod. F1262) diluição 1:20 em PBS/BSA 0,1M pH 7,4. A incubação ocorreu à temperatura ambiente e na ausência de luz, durante 60 minutos. A montagem com lamínula foi feita em gelatina glicerizada.

As observações foram realizadas em fotomicroscópio Jena-Lumar acoplado em um sistema de epifluorescência composto com filtro de excitação 480 nm e filtro de barreira 510 nm. Foram utilizados filmes 35 mm Kodacolor (Kodak) ISO400 para obtenção de fotomicrografias de fluorescência.

4.4.2 - Imunoperoxidase em cortes de congelação

As lâminas contendo criocortes foram lavadas em PBS 0,02M pH 7,4 por 3 vezes de 10 minutos e tratadas com PBS 0,02M contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio durante 30 minutos, para inibição da peroxidase endógena. O tratamento de bloqueio e a incubação dos anticorpos primários seguiram o mesmo protocolo descrito no item 4.4.1.

Após a incubação do anticorpo primário as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, anti IgG de coelho em cabra conjugado com peroxidase - kit PAP (Dako-EUA ou Nordic-França), durante 45 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados novamente com PBS e em seguida, lavados com tampão Tris/HCl 0,02M pH 7,4.

A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/ml (Sigma-St.Louis/EUA cod D5637) contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio diluída em Tris/HCl. Os criocortes foram contracolorados com verde de metila a 0,5% e as lamínulas montadas com gelatina glicerizada.

4.4.3 - Imunoperoxidase em cortes de parafina

Os cortes histológicos desparafinizados foram submetidos ao tratamento de inibição da peroxidase endógena como descrito em 4.4.2. Em seguida, algumas lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01M pH 6,0 e submetidas a um tratamento de 5 minutos ou 10 minutos em potência máxima, no microondas para melhor exposição dos epitopos. Um lote de cortes histológicos não foi submetido ao tratamento com o microondas, seguindo diretamente para as etapas subsequentes.

O tratamento de bloqueio variou de pH conforme o anticorpo primário a ser utilizado. No caso da anticatepsina D o bloqueio foi realizado com PBS 0,1M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e para a anticatepsina B, o bloqueio foi

realizado com o PBS/BSA em pH 8,2, durante 30 minutos em temperatura ambiente.

A incubação dos anticorpos primários anticathepsina D e B foi feita de acordo com o protocolo anteriormente descrito no item 4.4.2. A diferença constituiu no pH utilizado na solução de PBS/BSA para diluição dos anticorpos.

A incubação do anticorpo secundário e a revelação do conjugado em nada diferiu da reação descrita no item 4.4.2 para reação de imunoperoxidase. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas em gradientes de álcool etílico e para montagem permanente foi utilizado bálsamo sintético (Entellan - Merck).

4.4.4 - Imunofluorescência em cortes de parafina

O tratamento de bloqueio, a incubação dos anticorpos primários, assim como o tratamento no microondas a que foram submetidos os cortes, foram iguais ao procedimento descrito no item anterior para a técnica de imunoperoxidase.

O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho (em cabra) conjugado com o fluorocromo Cy2 (Amersham) na diluição de 1:50 em PBS/BSA 0,01M pH 7.4 e a incubação foi feita por 1 hora, em temperatura ambiente, protegida da luz. As observações foram feitas no mesmo microscópio de fluorescência descrito no item 4.4.1.

4.4.5 - Controles

Foram utilizados rim ou fígado de ratos Wistar e de camundongos Swiss coletados e processados nas mesmas condições dos materiais do nosso experimento. As lâminas contendo criocortes ou cortes de parafina de rim ou fígado foram processadas simultaneamente, nas reações de imunoistoquímica,

para controle positivo da reação. Foram utilizados ainda, como controles negativos, cortes onde não foram incubados os anticorpos primários.

4.5 - Procedimento para imunomarcação a nível ultra-estrutural

Foram utilizados cortes ultrafinos de LR-White coletados em telas de níquel. As telas foram lavadas com PBS/BSA pH 7,4. O anticorpo primário desejado foi diluído em PBS/BSA 0,5% pH 7,4 e incubado “over night”, em câmara úmida, à temperatura de 4° C. Posteriormente, as telas foram submetidas a várias lavagens em PBS 0.02M pH 7.4, incubadas com proteína A-gold (15 nm) diluída em PBS/BSA por 30 minutos. Após a lavagem, que foi feita por várias passagens na água milliQ, os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 1% (Merck), citrato de chumbo de Reynolds e revestidos com película de carbono. As observações foram feitas nos microscópios eletrônicos de transmissão ZEISS EM 9S (60kv) e JEOL 100 CX II.

4.6 - Processamento imunoquímico

4.6.1 - Obtenção de homogeneizados

Foram utilizados de 2 a 5 animais de cada um dos seguintes ddg: 11^o, 13^o, 15^o e 18^o, para obtenção do homogeneizado tecidual. Os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical após a inalação de vapores de éter e as placentas foram cuidadosamente removidas e dissecadas sobre placas de Petri refrigeradas com gelo. Os fragmentos finamente recortados foram pesados e suspensos (na proporção de 30g/l) em Tampão PIPES 5 mM (Sigma-St.Louis/EUA cod P6753) contendo 0,3M de sacarose. A homogeneização mecânica foi realizada em tubos de vidro (Thomas nº AA92), com pistilo de

teflon, em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 2.000 R.P.M. durante 10 minutos a -5°C , em centrífuga refrigerada Sorval (modelo RC2-B, rotor de ângulo fixo SS34). A cada 500 μl de sobrenadante foram adicionados 100 μl de triton X-100 (Reagem - Rio de Janeiro/BRA) e 400 μl de água destilada e centrifugados novamente a 15.000 R.P.M. durante 10 minutos a -5°C . Os sobrenadantes foram misturados na proporção de 1:1 em tampão amostra para eletroforese constituído de: (2 ml de Tris-HCl 0,5M pH 8,6, 2 ml de glicerol, 2 ml de SDS (Sigma - St. Louis/EUA cod L3771) a 10%, 200 μl de β -mercaptoetanol (Sigma - ST. Louis/EUA cod M7154), 400 μl de azul de bromofenol a 0,5% e 1,4 ml de água destilada). Em seguida, foram levados ao banho-maria fervente durante 3 minutos. A concentração final dos homogeneizados obtidos foi de 10%. As amostras preparadas pelo processo acima foram alicotadas e mantidas congeladas em "freezer" a -20°C até o momento de uso.

4.6.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS em miniplaca vertical

Os géis de poliacrilamida/bisacrilamida SDS foram preparados segundo o método de Laemli (1970) nas concentrações de: 10%, 12,5%, 15% e 20% ou na forma de gradiente de concentração de 10 a 15%, 12,5 a 17,5% e de 15 a 20% para os géis de separação. O gel de preparação foi sempre utilizado a 4,5%.

As miniplacas (10 x 9,5 cm ou 8 x 8 cm) foram montadas em uma cuba vertical de eletroforese (Dual system - Sigma) com tampão para cuba que consistiu de: 0,6% de Tris-base, 3% de glicina e 1% de SDS a 10% (Sigma - St. Louis/EUA cod L3771). Antes de serem distribuídas nas canaletas, as amostras dos homogeneizados foram levadas em banho-maria fervente por 1 minuto e, dependendo do pente utilizado, foram aplicados volumes que variavam de 5 a 20 μl . As corridas foram sempre acompanhadas por um padrão de peso

molecular (MW-SDS-70, Sigma). A fonte de corrente contínua foi ajustada para 20 mA/80V e a cuba mantida à temperatura de 4°C.

Ao término da corrida, alguns géis foram corados com “Coomassie brilliant blue” a 0,25% para conferir o padrão de separação eletroforético das bandas e comparar com as referências utilizadas. Outros foram transferidos para membrana de nitrocelulose.

4.6.3 - Transferência para membrana de nitrocelulose

A transferência para membrana de nitrocelulose (S&S NC) foi feita em uma cuba de sistema “semi-dry” (Taito - Japan) conectada a uma fonte (Técnica Permatron) ajustada para uma corrente contínua de 2 mA/cm², durante 1 hora. O tampão de transferência utilizado foi composto de 0,3% de Tris base (Sigma) contendo: 0,15% de glicina (Merck) e 1% de metanol (Merck).

4.6.4- Reação imunoquímica

A membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão de lavagem (PBS 0,02M pH 7,4 com 0,3% de tween 20) e tratada com tampão de bloqueio (PBS 0,02M pH 7,4 com 0,5% de BSA, 0,1% de tween 20 e 15 mM de NaN₃) durante 30 a 40 minutos. Posteriormente, foi feita a incubação com o anticorpo primário anticatepsina B ou D, diluído 1:500 em PBS/BSA durante 12 horas, à temperatura de 0 a 4°C. A membrana foi lavada em tampão de lavagem e incubada com o anticorpo secundário (IgG de coelho conjugado com peroxidase em cabra - kit PaP - Dako Chem.) por 30 minutos à temperatura ambiente. A revelação foi feita com DAB a 0,5% (Sigma) diluída em Tris HCl 0,05M pH 7,4. Foram obtidos os “Rfs” das bandas positivas para o cálculo dos respectivos pesos moleculares.

5 - RESULTADOS

5.1. Análise Morfológica

5.1.1 - Descrição morfológica e localização das células trofoblásticas gigantes (CTGs) a nível da microscopia fotônica

As descrições morfológicas a seguir foram baseadas em análises de cortes histológicos de materiais processados em parafina e/ou em cortes semi-finos de materiais incluídos em resina epóxi.

As CTGs caracterizavam-se morfológicamente pelo seu tamanho avantajado, formato irregular devido aos seus prolongamentos citoplasmáticos, núcleo grande com cromatina pouco condensada, nucléolos evidentes e vesículas intracitoplasmáticas de tamanhos variáveis (Fig. 1). Os prolongamentos citoplasmáticos uniam-se aos prolongamentos de células contíguas delimitando lacunas de tamanho variável. Eritrócitos, ou agregados destes, assim como restos celulares, foram comumente encontrados tanto no interior de CTGs quanto nas lacunas delimitadas pelos seus prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 1). Estas características morfológicas gerais foram utilizadas para identificação desta população celular nos diferentes estádios analisados.

Não sendo o propósito deste trabalho, não foram mencionados os aspectos morfológicos do embrião encontrados em desenvolvimento de cada estadio, além de que, nos materiais coletados após o 11^o ddg, o embrião foi removido durante a coleta.

5.1.1.1 - Oitavo dia de gestação

O blastocisto encontrava-se implantado na região antimesometrial do

útero e as CTGs ocupavam todo o perímetro deste blastocisto formando a interface com as células endometriais. As células endometriais desta região encontravam-se decidualizadas. As CTGs em contato com o tecido materno apresentavam formato irregular devido aos inúmeros prolongamentos citoplasmáticos que freqüentemente eram encontrados insinuando-se entre as células deciduais presentes na interface. Nesta localidade, as células maternas apresentavam-se em graus variados de degeneração. Os prolongamentos citoplasmáticos de CTGs, que estabeleciam contato entre si e com CTGs contíguas, delimitavam lacunas de tamanhos variados, onde eram encontradas células sangüíneas maternas. Esta imagem era encontrada ao longo da área periférica que delimitava o blastocisto (Fig. 2). No citoplasma das CTGs encontradas nestas regiões observava-se um grande número de vesículas de tamanhos variados. Estas vesículas apresentavam conteúdo heterogêneo, sendo freqüentemente encontradas hemácias e restos celulares. As células deciduais em contato direto com as CTGs apresentavam ocasionalmente sinais de degeneração, isto é, contorno celular pouco nítido e graus variados de picnose nuclear.

Na região voltada para o polo mesometrial do blastocisto, encontrava-se o cone ectoplacentário (CEP) constituído por um agregado de células de origem trofoblástica (Fig. 3). As células trofoblásticas indiferenciadas, localizadas na base do CEP e em contato com os embrioblastos, eram pequenas e poligonais, enquanto aquelas mais próximas da periferia tornavam-se maiores e davam continuidade às CTGs (Fig. 3) que ocupavam todo o perímetro do CEP em contato com o tecido materno. As CTGs presentes no CEP também delimitavam grandes espaços ocupados por células sangüíneas maternas extravasadas, juntamente com outras células do estroma e do epitélio uterino em degeneração (Fig. 3).

A luz uterina da região mesometrial apresentava o seu revestimento epitelial íntegro, apenas na sua extremidade mais distante do local onde se desenvolvia o CEP. Junto ao CEP, a luz uterina estava destituída do seu epitélio

e em seu interior era encontrada uma grande quantidade de restos celulares, células maternas em degeneração e hemácias.

O endométrio da região mesometrial caracterizava-se ainda pela dilatação dos seus vasos sangüíneos que delineavam trabéculas formadas pelas células do estroma endometrial. Estas células do estroma apresentavam características de células em processo de decidualização, sendo freqüentemente encontradas células granulosas metriais.

5.1.1.2 - Nono dia de gestação

As CTGs foram encontradas nas mesmas localizações descritas para o 8º ddg, isto é, ao longo de todo o perímetro embrionário e do CEP. Estas CTGs apresentavam basicamente as mesmas características morfológicas já descritas anteriormente, porém algumas células apresentavam-se maiores e foram encontradas, com maior freqüência, células contendo vesículas intracitoplasmáticas na região antimesometrial.

O CEP aumentou bastante seu tamanho, mantendo o formato cuneiforme, porém expandindo-se lateralmente. Entre as células trofoblásticas não diferenciadas do CEP, foram observados interstícios ocupados por células sangüíneas maternas. As CTGs do CEP eram encontradas não apenas junto do seu perímetro, mas também em áreas mais distantes ao longo da luz uterina, que neste momento não apresentava mais o revestimento epitelial. No endométrio, próximo e acima do CEP, os vasos sangüíneos apresentavam a sua luz dilatada formando grandes seios que delimitavam trabéculas de espessura variada, contendo células em decidualização. Junto a estas trabéculas foram encontradas CTGs, insinuando-se entre as células maternas (Fig. 4) de aparência sadia ou em graus variados de degeneração. Foram encontradas, também, CTGs ou prolongamentos citoplasmáticos destas, invadindo a luz de vasos sangüíneos maternos. As CTGs da região do CEP apresentavam vesículas

intracitoplasmáticas com as mesmas características morfológicas da região antimesometrial, no entanto, em menor quantidade.

5.1.1.3 - Décimo primeiro dia de gestação

Com o desenvolvimento e crescimento do embrião, a parede uterina da região antimesometrial tornava-se menos espessa, ocorrendo uma redução do número de camadas de células decíduais do endométrio e um adelgaçamento do miométrio como um todo. Toda a extensão do saco vitelino era revestida por uma ou mais camadas de CTGs justapostas, que mantinham-se em contato com o endométrio decidualizado. Neste período, as CTGs desta região atingiram sua maior dimensão e eram observados próximo ou junto a elas componentes do tecido materno em graus variados de degeneração. Era freqüente a observação de células maternas em degeneração confinadas pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs. Estas CTGs, presentes principalmente na região mesometrial, possuíam um grande número de vesículas intracitoplasmáticas semelhantes às encontradas no 8º e 9º ddg.

O CEP, que no 8º e 9º ddg formava um agregado cuneiforme de células trofoblásticas, tornava-se uma massa celular maior que se estendia lateralmente acompanhando o crescimento do embrião (Fig. 5). Esta massa celular na sua base era constituída, neste momento, por células trofoblásticas indiferenciadas entremeadas de um delicado tecido mesenquimal e este conjunto ocupava a maior extensão junto ao embrião em desenvolvimento. Logo acima desta base eram encontradas células delgadas e alongadas que uniam-se a células adjacentes, formando pequenas traves descontínuas. Entre estas traves eram formadas lacunas de tamanhos variados preenchidas por hemácias. Esse conjunto celular constituía o esboço do que seria a camada do labirinto-trofoblasto. Acima destas traves, em direção ao mesométrio, eram encontrados pequenos grupos de células poliédricas justapostas, os quais na placenta madura constituiriam o conjunto de células da camada do espôgio-trofoblasto.

Entre estas células e as células do endométrio, foram normalmente encontradas 2 a 3 camadas de CTGs de tamanho e formato variados, delimitando a interface materno-fetal (Fig. 5). A grande maioria destas CTGs possuíam um menor número de vesículas intracitoplasmáticas se comparadas com as CTGs da região mural. Foram encontrados também, nesta região, prolongamentos de CTGs penetrando no interior de vasos sanguíneos maternos. Neste momento, já podia ser identificado um contorno discóide para o conjunto formado pelas células originadas do CEP (Fig. 5). Nas bordas deste primórdio do disco placentário encontrávamos um acúmulo maior de CTGs (Fig. 6), que estavam em continuidade com as CTGs que faziam o revestimento da região antimesometrial. Nesta região também era observada a formação de um grande número de lacunas delimitadas pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs que confinavam sangue materno e restos celulares em degeneração.

Concomitantemente, o endométrio mesometrial acima da placenta fetal em formação mostrava alterações significativas, entre as quais, maior irrigação sanguínea com dilatação dos vasos, organização das trabéculas de células decíduais e um acúmulo de células granulosas metriais (Figs. 5, 6).

5.1.1.4 - Décimo terceiro dia de gestação

A partir do 13^o ddg foi dada ênfase à região mesometrial onde estava ocorrendo o processo de placentação. Toda a região antimesometrial foi removida juntamente com o embrião durante o processamento dos espécimes.

No 13^o ddg a placenta em formação assumiu um contorno nitidamente discóide, onde já se distinguiam claramente as três camadas trofoblásticas placentárias (Fig. 7). A primeira camada formada pelas CTGs ocupava todo o perímetro externo do disco placentário que se estendia até as suas bordas. Na abóbada placentária as CTGs tornaram-se mais alongadas, porém projetavam ainda os seus prolongamentos entre as células decíduais ou na direção dos vasos sanguíneos maternos (Fig. 8). Estas CTGs apresentavam pequena

quantidade de vesículas intracitoplasmáticas e no interior destas não foram identificadas grandes quantidades de hemácias. Nas lacunas menores confinadas pelos prolongamentos citoplasmáticos, eram encontradas hemácias maternas e restos celulares. Nas bordas do disco placentário, era observado o acúmulo maior de CTGs, porém já em número mais reduzido se comparado ao 11º ddg.

A camada do labirinto, formada por uma trama tridimensional de traves celulares que confinavam espaços de tamanhos variados, contendo sangue materno, era a mais espessa da placenta (Fig. 7). No eixo destas traves do labirinto, eram encontradas hemácias nucleadas. Entremeadas nesta camada foram encontrados, esporadicamente, conjuntos de células trofoblásticas pequenas indiferenciadas.

Entre o labirinto e a camada de CTGs organizava-se a camada do espôncio-trofoblasto que era constituída por 3 a 10 camadas de células poligonais justapostas. As células do espôncio apresentavam o citoplasma basófilo, o núcleo central e esférico, contendo pequenas áreas de condensação cromatínica.

Na região abaixo da camada do labirinto, junto à base da placenta, verificavam-se agregados de pequenas células trofoblásticas ainda não diferenciadas entremeadas com o tecido mesenquimal extra-embrionário e vasos sangüíneos fetais. Este conjunto apoiava-se sobre a membrana de Reichert, cuja superfície voltada para a porção embrionária era revestida pelo endoderma parietal.

5.1.1. 5 - Décimo quinto dia de gestação

Com o crescimento da placenta fetal, decorrente principalmente do aumento da camada do labirinto, verificava-se uma redução na espessura dos tecidos que organizavam a porção materna. O endométrio da região mesometrial, também conhecido como decídua basal, tornava-se uma camada

mais fina com acúmulo de células granulosas metriais nesta região. Algumas células do endométrio, próximas à interface com a placenta fetal, apresentavam o seu citoplasma extraído, dando aspecto de células em degeneração.

As CTGs, encontradas em íntimo contato com as células da decídua basal, delineavam o limite da interface e, comumente, apresentavam formato alongado e irregular, devido à projeção dos seus prolongamentos entre as células deciduais. Foram freqüentemente encontradas CTGs contornando internamente a luz dos vasos sangüíneos maternos que se abriam nesta localização (Fig. 9). Era comum a presença de restos celulares confinados pelos prolongamentos das CTGs, assim como, células de origem materna em degeneração, próximas às CTGs (Fig. 9). O número de vesículas intracitoplasmáticas se apresentava menor e estas normalmente continham apenas restos celulares.

O acúmulo de CTGs encontrado nas bordas do botão placentário era menos proeminente neste estágio. As CTGs destas áreas mantinham o formato irregular, enquanto aquelas da abóboda placentária tornavam-se mais achatadas. As lacunas delimitadas pelos seus prolongamentos também aparentavam ser mais colabadas e distendidas, acompanhando a curvatura da placenta. O citoplasma destas CTGs tinha a aparência mais homogênea, sendo menos freqüentes as células com materiais fagocitados em seu interior.

As células poligonais, abaixo da camada de CTGs, que compunham o espôncio-trofoblasto eram facilmente identificadas (Fig 10) porém, junto a estas, era encontrada esporadicamente uma população celular, cuja característica principal era o aspecto esponjoso do seu citoplasma.

A camada labiríntica constituía uma trama de traves celulares extremamente complexa, podendo ser encontrados grupos de células trofoblásticas poligonais pequenas em seu interior. No eixo das traves celulares do labirinto foram observados vasos sangüíneos fetais onde eram encontradas hemácias nucleadas. Um tênue tecido mesenquimal (Fig. 10) também preenchia o eixo das traves do labirinto e dava continuidade ao tecido mesenquimal

encontrado na base da placenta. Na região basal da placenta, eram encontrados pequenos agregados de células trofoblásticas indiferenciadas embebidas no tecido mesenquimal, além de vasos sanguíneos fetais de diversos calibres.

5.1.1.6 - Décimo oitavo dia de gestação

As CTGs encontradas no 18º ddg eram bastante delgadas, com o núcleo alongado e mais difíceis de serem identificadas na maior extensão da placenta com exceção das bordas placentárias, onde formavam grupos de células menos achatadas (Fig 11). As CTGs praticamente não possuíam mais vesículas intracitoplasmáticas e os seus prolongamentos eram mais escassos. Além disso, tornou-se mais freqüente a presença de células decíduais intactas fazendo justaposição às CTGs.

As células da camada do espôncio tornavam-se mais globosas e de citoplasma mais claro, estando às vezes, aparentemente em contato com as células maternas, onde era difícil distingui-las das próprias CTGs.

A camada do labirinto era a mais proeminente, sendo observados vasos fetais contendo hemácias fetais (agora anucleados) no interior das traves celulares (Figs. 11 e 12). Não foram mais encontradas células trofoblásticas indiferenciadas nesta região. Algumas células desta camada apresentavam áreas citoplasmáticas extraídas em cortes de parafina, ou preenchidas de material homogêneo em cortes de resina.

A porção materna tornou-se bastante delgada, com o endométrio decidualizado reduzido a uma fina camada, que dava continuidade ao miométrio através de uma delgada camada de estroma não decidualizado. As células granulosas metriais, também em menor número, foram encontradas no endométrio e no miométrio.

5.1.2 - Descrição ultra-estrutural das CTGs

As descrições ultra-estruturais foram focalizadas nas CTGs a fim de se estabelecer os padrões morfológicos destas células nos períodos estudados, dando subsídios para as análises posteriores de imunomicroscopia eletrônica.

As CTGs ao nível ultra-estrutural caracterizavam-se pelo seu citoplasma rico em polissomas ou ribossomas livres, com o retículo endoplasmático granular proeminente, enquanto o retículo endoplasmático liso era menos evidente. As mitocôndrias presentes eram pequenas, de formato esférico ou elíptico, e apresentavam as projeções da membrana interna predominantemente tubulares. O complexo de Golgi, na maioria das células, era bastante desenvolvido e ocupava a área perinuclear. Foi comum a observação de vesículas nas proximidades desta organela, assim como eventuais vesículas com membranas revestidas. Feixes de filamentos orientados, em vários sentidos, foram encontrados com frequência no citoplasma das CTGs e nos seus prolongamentos. Vesículas de tamanhos variados lembrando lisossomas secundários eram freqüentes, assim como gotículas eletrondensas de lipídios também foram encontradas no interior das CTGs.

O envoltório nuclear apresentava contorno irregular podendo apresentar invaginações profundas, e continha numerosos poros nucleares. A cromatina era, no geral, pouco condensada (Fig. 16), no entanto, em algumas áreas ocorria uma maior condensação formando grumos.

Na superfície celular livre, assim como ao longo dos prolongamentos citoplasmáticos foram encontrados microvilos irregulares, enquanto, nas regiões de contato entre CTGs contíguas e/ou seus prolongamentos, era comum a presença de junções do tipo aderente (Fig. 14) e desmossoma (Fig. 13).

As CTGs encontradas nas frentes de invasão e em contato com as células maternas (Figs. 14, 15 e 16) caracterizavam-se pela presença de fagossomas contendo células ou fragmentos celulares em graus variados de degeneração. Os prolongamentos citoplasmáticos das CTGs delimitavam

espaços de tamanhos variados, onde foram encontrados tanto grupos de células sangüíneas e restos celulares em degeneração (Fig. 14), quanto células sangüíneas aparentemente saudáveis. Foi comum a presença de células decíduas em contato com as CTGs de 8^o a 13^o ddg, com aspectos de degeneração (Figs. 14 e 15). Porém, células decíduas aparentemente normais também estavam presentes junto às CTGs. Nos estágios mais avançados da gestação era mais freqüente encontrar CTGs ou seus prolongamentos citoplasmáticos próximos e em contato com as células decíduas aparentemente íntegras (Fig. 16). Não foi observada qualquer forma de junção celular entre as CTGs ou seus prolongamentos com células de origem materna.

5.2 - Reações imunoistoquímicas em microscopia fotônica

Foram testadas variações de técnicas para a otimização do método imunoistoquímico na detecção das anticatapsinas D e B, visando atender a reprodutibilidade e sensibilidade da reação, assim como a resolução das imunomarcações. Uma sinopse dos resultados obtidos pelos procedimentos testados está ilustrada nas Tabelas I e II.

5.2.1 - Imunofluorescência em criocortes para anticatapsinas D e B

As imunomarcações realizadas sobre os criocortes afetaram a preservação morfológica do tecido, o que prejudicou as análises quanto à localização dos sítios de imunomarcação. Dentre as dificuldades encontradas salienta-se a obtenção dos criocortes, que se mostravam friáveis devido ao alto teor de sangue no interior da maioria destes materiais.

O imunoconjugado de isotiocianato de fluoresceína utilizado nesta técnica mostrou-se bastante fotossensível, não permitindo análises prolongadas através do microscópio de fluorescência ou uma documentação fotográfica

apropriada da imunomarcação. Frente a estas dificuldades, os resultados obtidos por esta técnica serviram apenas como dados preliminares e de orientação quanto aos procedimentos imunoistoquímicos.

Foi detectada fluorescência positiva nas reações para anticatepsina D em CTGs localizadas nas regiões do CEP e mural do embrião nos materiais de 8º e 9º ddg (Fig. 17), assim como naquelas presentes nas bordas e na abóbada das placentas do 11º ao 15º ddg. O padrão de fluorescência encontrado nestas CTGs era de aspecto difuso e de intensidade variável.

Foi observada reação positiva para a anticatepsina B nas CTGs da região do CEP, da região mural do embrião e nas CTGs das bordas e da abóbada placentária (Fig. 18). As CTGs encontradas nas placentas apresentaram uma fluorescência fraca e com dificuldades na reprodutibilidade do método devido aos problemas de preservação dos cortes.

Na camada labiríntica obtivemos uma positividade bastante fraca e difusa nas células de suas traves no 13º e 15º ddg (Fig. 19), tanto para anticatepsina D quanto para a B. Nos materiais de 18º ddg, a intensidade da fluorescência era menos acentuada, e por isto de difícil documentação fotográfica. O espôncio-trofoblasto não apresentou reação positiva detectável. As células decíduais em torno do perímetro do embrião não apresentaram fluorescência detectadas por esta técnica, porém as células granulosas metriais apresentaram intensa positividade para a anticatepsina D.

5.2.2 - Imunoperoxidase em cortes de congelção

A necessidade da inibição da peroxidase endógena neste método, exigindo um tratamento com H_2O_2 , acarretou prejuízos na morfologia e na aderência dos cortes nas lâminas. A reprodutibilidade e a sensibilidade das reações imunoistoquímicas pelo método de revelação do conjugado de peroxidase pela diaminobenzidina em criocortes mostraram-se satisfatórias para as duas catepsinas utilizadas (Tabela I e II). No entanto, a análise dos

resultados ainda continuou bastante prejudicada pela falta de resolução decorrente da deficiência na preservação morfológica do material em estudo.

5.2.2.1 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D

Para a catepsina D obtivemos reações positivas nas CTGs encontradas em praticamente todos os estadios analisados (Fig. 20), com exceção do 18º ddg. A localização dos sítios reativos foi dificultada pela espessura dos cortes e constante ruptura do tecido em áreas de interesse.

Foi constatada positividade nas células que constituem as traves do labirinto (Fig. 21) e no endométrio foram constatadas reações positivas fracas e irregulares nas células decíduais que circundam o blastocisto e nas células granulosas metriais.

5.2.1.2 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B

A anticatepsina B apresentou positividade nas CTGs na maioria dos estadios analisados à semelhança da anticatepsina D (Fig. 22). O padrão de distribuição das marcações era difuso no citoplasma e a intensidade de reação apresentava-se sempre mais tênue do que aquelas observadas para a anticatepsina D. Este padrão de reatividade foi observado também para o labirinto e para as células decíduais maduras foram encontradas marcações fracas e esporádicas nas células presentes na interface com as CTGs.

5.2.3 - Imunoperoxidase em cortes de parafina

As reações de imunoperoxidase realizadas tanto em cortes fixados com paraformaldeído (PFA) 4%, quanto naqueles contendo glutaraldeído (GTA) 0,1%, sem o tratamento prévio com o microondas não apresentou sensibilidade para a detecção das anticatepsinas D e B (Tabelas I e II, respectivamente).

A reprodutibilidade no padrão de reatividade foi obtida após inúmeros testes com a utilização do microondas em diferentes tempos e potência. O padrão estabelecido, tendo como parâmetro de análise o grau de preservação morfológica, a sensibilidade e a especificidade das reações imunoistoquímicas, está apresentado nas Tabelas I e II e descrito a seguir. Porém, a adição do glutaraldeído na solução fixadora inibiu completamente a identificação destes antígenos mesmo com o tratamento pela microonda.

5.2.3.1 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D

A catepsina D foi detectada nas CTGs encontradas do 8º ao 18º ddg com intensidades variáveis. O produto da reação foi encontrado distribuído no citoplasma das CTGs podendo apresentar intensidades variáveis (Fig. 23). Da mesma forma, os prolongamentos citoplasmáticos e as áreas em contato com células de origem materna apresentaram forte marcação (Fig. 23). Os compartimentos contendo restos celulares, assim como hemácias supostamente confinadas entre os prolongamentos citoplasmáticos apresentaram, também, intensa reação. Na região do CEP, além das CTGs, as células trofoblásticas globosas encontradas mais periféricamente no cone apresentaram marcação significativa (Fig. 24). As hemácias no interior do CEP, ou mesmo próximas a este, também apresentaram-se positivas. As CTGs da abóbada placentária apresentaram reações que marcavam todo o citoplasma ou parte deste (Fig. 25), com variação de intensidade. As CTGs desta região encontradas no 18º ddg apresentaram menor intensidade de reação, sendo encontradas formas totalmente negativas. Na região mural do embrião de 8º, 9º e 11º ddg, as CTGs apresentaram além do padrão difuso de marcação, uma reação intensa em locais bem definidos no seu interior (Fig. 23).

Foram encontradas ainda reações positivas nas células labirínticas das placentas analisadas (Fig. 25). Nas placentas de 15º e 18º ddg foram encontrados grupos de células com reações positivas com localização e

morfologia compatível ao espôncio-trofoblasto. As células decíduais maduras em contato com as CTGs apresentaram, esporadicamente, reações positivas em forma de grânulos intracitoplasmáticos (Fig. 23). As células granulosas metriais apresentaram reação positiva (Fig. 26).

Os controles negativos realizados, omitindo-se o anticorpo primário no protocolo da reação imunoistoquímica, mostraram-se inteiramente negativos, exceto sobre as hemácias, presentes no interior das placentas e no CEP (Fig. 27). Os controles positivos, onde foram utilizados cortes da região cortical do rim, mostraram marcações positivas intensas no interior das células dos túbulos coletores renais, fracamente no ápice das células dos túbulos contorcidos proximais e negativas nos glomérulos renais (Fig. 28).

5.2.3.2 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B

Para reações imunoistoquímicas pela técnica de imunoperoxidase também observaram-se reações positivas para a anticatepsina B nas CTGs do 8º ao 18º ddg com intensidades variáveis. As reações estavam presentes no interior das CTGs em padrão predominantemente puntiforme, ou em áreas definidas do citoplasma (Fig. 29). Não foram observadas reações positivas intensas na região do CEP, nas CTGs da periferia, assim como na região mural (Fig. 30). As hemácias encontradas nesta região mostraram intensa positividade. As CTGs encontradas na região da abóbada placentária também apresentaram reação positiva no citoplasma, porém com variação de intensidade, sendo a maioria totalmente negativas no 18º ddg (Fig. 31).

As traves labirínticas dos diferentes dias de gestação apresentaram-se fracamente positivas com menor intensidade que as CTGs. As células decíduais em contato com as CTGs também apresentaram reações positivas (Figs. 29 e 31). Foram constatadas reações positivas em algumas células da camada do espôncio-trofoblasto (Fig. 31) nos estágios mais avançados da gestação.

Nos controles negativos, onde foi omitido do protocolo a reação com o anticorpo primário, não foram apresentadas reações positivas no interior das CTGs. Porém, estes controles apresentaram uma intensa reação de fundo sobre as hemácias que se encontravam próximas a elas (Fig. 32). Os controles positivos realizados em cortes de rim mostraram reações positivas específicas no interior dos túbulos contorcidos proximais (Fig. 33).

5.2.4 - Imunofluorescência em cortes de parafina revelados com o conjugado fluorocromo Cy2

Foi utilizado o mesmo procedimento adotado para reação de imunoperoxidase em parafina, modificando-se o imunoconjugado de revelação na tentativa de se avaliar a especificidade da reação da diaminobenzidina sobre as hemácias.

O conjugado com o fluorocromo Cy2 mostrou-se mais resistente à ação da luz do que a fluoresceína, mantendo a sua fluorescência estável por um período mais longo de duração, facilitando as análises e a documentação fotográfica.

5.2.4.1 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina D

As reações imunoistoquímicas para 8^º e 9^º dddg mostraram reações positivas intensas na região do CEP para a catepsina D e reações totalmente negativas para as hemácias localizadas nesta área (Fig. 34). As CTGs da região mural do embrião mostraram o seu citoplasma positivo e no interior destes, foram encontrados contornos de vesículas inteiramente negativas (Fig 35). As CTGs encontradas nas bordas da placenta (Fig 36) apresentaram reações positivas mais intensas do que aquelas encontradas na abóbada placentária sendo algumas, desta região, inteiramente negativas de acordo com a resolução do microscópio de fluorescência.

As células do labirinto apresentaram reações positivas puntiformes em todos os estadios analisados (Fig. 36). Foi detectada com frequência, a fluorescência nas células da camada do espongio-trofoblasto de 15º e 18º ddg, nas células granulosas metriais distribuídas pelo endométrio, porém praticamente não detectada nas células decidualizadas próximas às CTGs.

Os controles realizados em cortes de rim apresentaram intensa fluorescência nas células dos túbulos coletores renais, fracamente positivas no ápice das células do túbulo contorcido proximal e negativas nos demais segmentos de néfron. (Fig. 37). Os controles negativos, onde não foi incubada a anticatepsina, não apresentaram fluorescência (não documentado).

5.2.4.2 - Reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B

As reações positivas para a anticatepsina B foram constatadas nas células trofoblásticas mais globosas do cone (Fig. 38) e nas CTGs localizadas na região mural do blastocisto para o 8º e 9º ddg (Fig. 39). Foi frequente a observação de áreas intracitoplasmáticas com maior intensidade de reação (Fig. 39 e 40). Não foi observada reação de fundo inespecífica nas hemácias. A emissão de cor amarela não considerada positiva, considerando-se o espectro de emissão de cor verde (510 nm) do fluorocromo Cy2. Foi observada fluorescência positiva nas CTGs localizadas nas bordas da placenta a partir do 13º ddg (Fig. 40). Nas CTGs da abóbada da placenta, as reações encontradas foram bem mais tênues e nos últimos estágios placentários praticamente não foram detectadas reações.

As células das traves do labirinto apresentaram reação positiva difusa em todos os ddg estudados, porém sendo sempre mais tênue do que a positividade encontrada no interior das CTGs. Algumas células, encontradas na camada do espongio-trofoblasto dos estágios mais avançados da gestação, apresentaram positividade para esta catepsina. Não foi detectada fluorescência junto às células deciduais próximas às CTGs.

Os controles realizados em cortes de rim de camundongo apresentaram reações positivas nas células dos túbulos proximais (Fig. 41), enquanto os controles negativos realizados em cortes de placenta não apresentaram fluorescência.

Tabela - I - Padrão das reações imunoistoquímicas para a anticatapsina D obtido com diferentes procedimentos de fixação e revelação das reações.

	Cortes de parafina									
	Criocortes									
	fluoresc. ¹	peroxidase	peroxidase				fluoresc. ²			
	PFA	PFA	PFA	PFA+GTA	PFA	PFA+GTA	PFA	PFA+GTA	PFA	PFA+GTA
			mw	s/mw	mw	s/mw	mw	s/mw	mw	s/mw
morfologia	P	R	S	B	S	B	S	B	S	B
reação espec	++	++	+++	+	-	-	+++	#	#	#
reação inesp	-	+	++	+	+	-	-	#	#	#

PFA - paraformaldeído 4%

- negativo

GTA - glutaraldeído 0,1%

+ reação fraca

fluoresc.¹ - isotiacianato de fluoresceína

++ reação moderada

fluoresc.² - fluorocromo Cy2

+++ reação intensa

mw - microondas

reações não realizadas

P - precária

R regular

S - satisfatória

B boa

Obs - o tempo de tratamento no microondas (mw) foi de 5 min.

Tabela - II - Padrão das reações imunoistoquímicas para a anticatepsina B, obtido com diferentes procedimentos de fixação e revelação das reações.

	Cortes de parafina									
	Criocortes									
	fluoresc. ¹	peroxidase	peroxidase				fluoresc. ²			
	PFA	PFA	PFA		PFA+GTA		PFA		PFA+GTA	
			mw	s/mw	mw	s/mw	mw	s/mw	mw	s/mw
morfologia	P	R	S	B	S	B	S	B	S	B
reação espec	++	++	++	-	-	-	+++	#	#	#
reação inesp	-	+	+	-	-	-	-	#	#	#

PFA - paraformaldeído 4%

- negativo

GTA - glutaraldeído 0,1%

+ reação fraca

fluoresc.¹ - isotiacianato de fluoresceína

++ reação moderada

fluoresc.² - fluorocromo Cy2

+++ reação intensa

mw - microondas

reações não realizadas

P - precária

R regular

S - satisfatória

B boa

Obs - o tempo de tratamento no microondas (mw) foi de 10 min.

5.3- Imunomicroscopia eletrônica

As reações de imunomarcacão para anticatepsina D, reveladas com a proteína A-gold, apresentaram partículas de ouro no interior de lisossomas (Fig. 42) e fagossomas (Fig. 43), ao lado de outras vesículas totalmente negativas em CTGs de diferentes dias de gestacão estudados. Foram encontradas, ainda, partículas de ouro indicando positividade para catepsina D nos compartimentos

envolvidos pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs (Fig. 44), que continham restos celulares ou componentes da matriz em degeneração (Fig. 45). Não foram encontradas imagens de imunomarcação positiva de vesículas liberando o seu conteúdo para o meio extracelular.

A imunomicroscopia eletrônica para a anticatepsina B mostrou fraca marcação sobre os lisossomas primários e fagolisossomas das CTGs analisadas (Fig 46). Com raras exceções, as marcações não eram significativas, isto é, o número de partículas de ouro não era maior do que aquele encontrado distribuído inespecificamente sobre os cortes. Não foram encontradas marcações significativas nos compartimentos extracelulares próximos às CTGs.

5.4 - “Western blotting”

Os padrões de bandejamento obtido pela eletroforese e “western-blotting” dos homogeneizados de placenta de camundongos de 11^º, 13^º, 15^º e 18^º ddg mostraram bandas reativas para as anticatepsinas D e B, que foram reconhecidas nas bandas correspondentes a 45 kD e 24 kD, respectivamente. Estas bandas correspondem às formas ativas destas enzimas (informação pessoal, Dr. S. Yokota). Em menor proporção obtivemos reações positivas para a anticatepsina D em bandas com o peso molecular equivalente a 34 kD e 52 kD e para a anticatepsina B foi constatada uma banda menos reativa para o peso molecular equivalente a 29 kD. Tais bandas correspondem as pró-formas destas enzimas. As intensidades de reações entre homogeneizados de diferentes dias de gestação não apresentaram diferenças significativas, sendo constatadas bandas equivalentes em todas as amostras analisadas.

6 - ILUSTRAÇÕES

.....

Figura 1: Fotomicrografia mostrando o aspecto geral das CTGs de 9º ddg encontradas na interface com o tecido materno. Notar a hipertrofia celular acompanhada da hipertrofia do núcleo (N) e os espaços confinando células sanguíneas maternas (setas). No interior do citoplasma são encontradas inúmeras vesículas (setas menores). Corte de parafina, HE. 640x.

Figura 2: Fotomicrografia mostrando as CTGs (setas) de 8º ddg na interface com o tecido materno da região mural do blastocisto (B). Nota-se na figura o endométrio (ED) e o endoderma parietal (cabeças de seta). Observar as lacunas formadas pelos prolongamentos das CTGs preenchidas com sangue materno. Corte semifino de resina Epon corado com azul de toluidina, 320x.

Figura 3: Fotomicrografia da área do cone ectoplacentário de um sítio de implantação uterina no 8º ddg. Blastocisto (B), cone ectoplacentário (CEP), CTGs (setas), endométrio decidualizado (ED). Observar a grande quantidade de sangue materno extravasado junto ao CEP (*) e o remanescente da luz uterina (★) na região mesometrial. Corte de parafina HE, 180x.

Figura 4: Fotomicrografia mostrando o detalhe das CTGs na frente de invasão do CEP no 9ºddg. Observar as CTGs (setas) e os seus prolongamentos (cabeças de seta) invadindo o tecido materno na região mesometrial. Corte de parafina HE, 640x.

Figura 5: Fotomicrografia mostrando o aspecto geral da placenta em formação no 11º ddg. Traves de células decidualizadas (D) na região mesometrial entremeadas de células granulosas metriais (cabeças de seta), CTGs na interface da placenta em formação (setas) espôncio-trofoblasto (E), primórdios do labirinto (PL) e endoderma parietal (setas menores) Vasos sanguíneos maternos (VM). Corte de parafina, HE, 100x.

Figura 6: Fotomicrografia da placenta em formação de 11º ddg em detalhe, mostrando o acúmulo de CTGs nas bordas do botão placentário. Observe o grande número de prolongamentos citoplasmáticos das CTGs (setas) formando lacunas que confinam sangue materno. Traves de células deciduais (D), vaso sanguíneo materno (VM) da região mesometrial. Corte de parafina corado com HE, 320x.

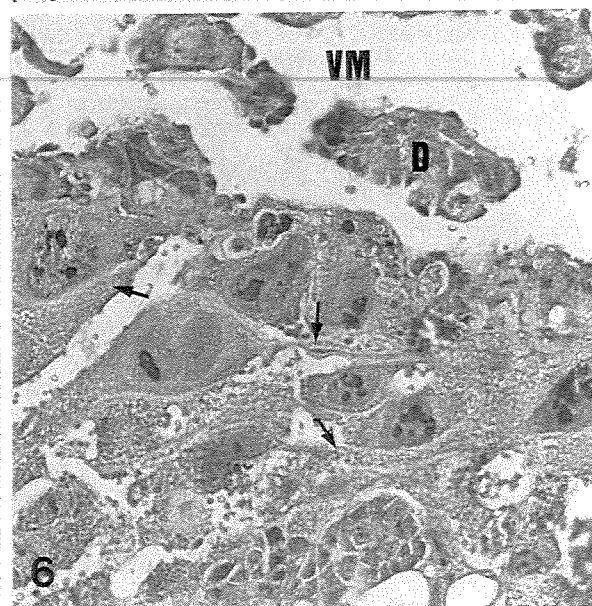
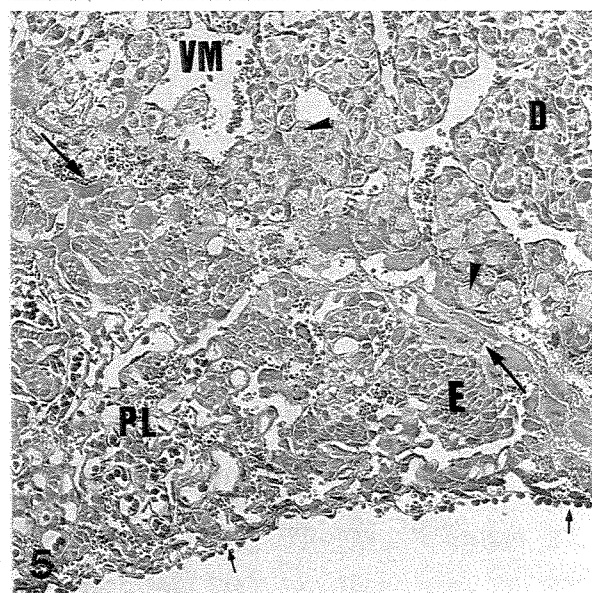
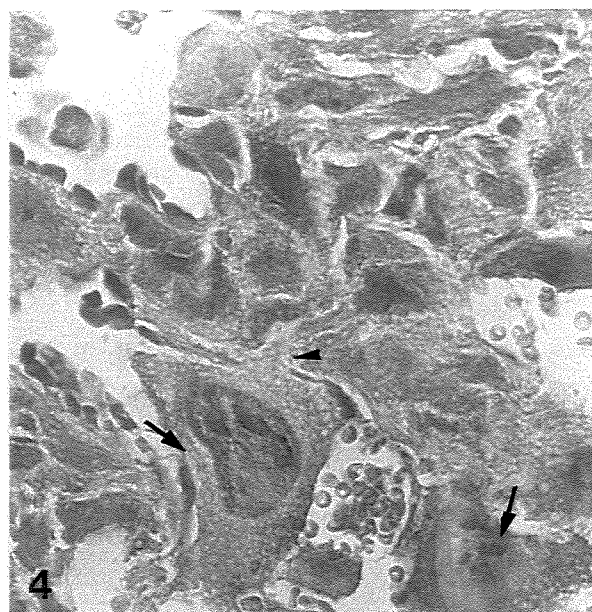
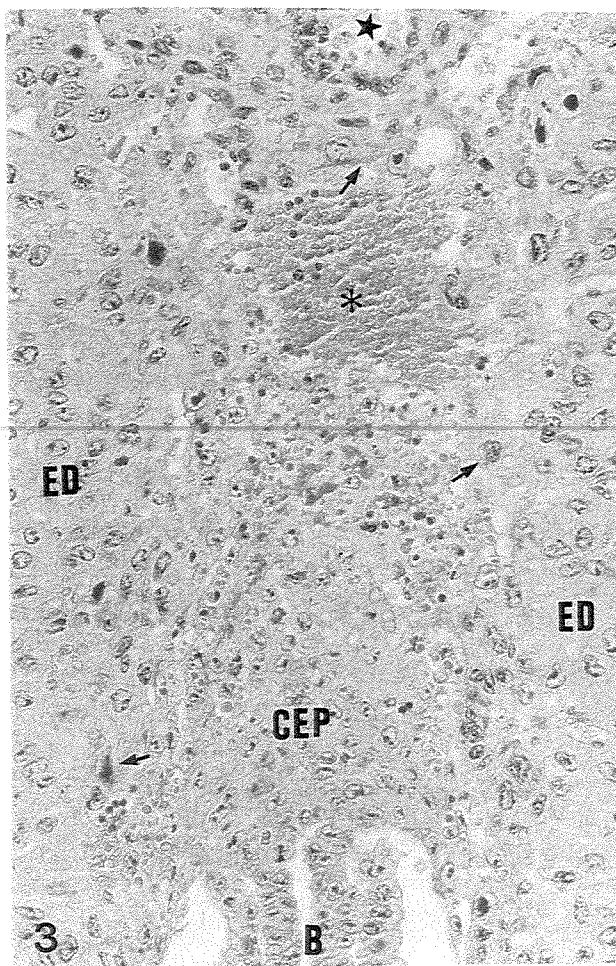
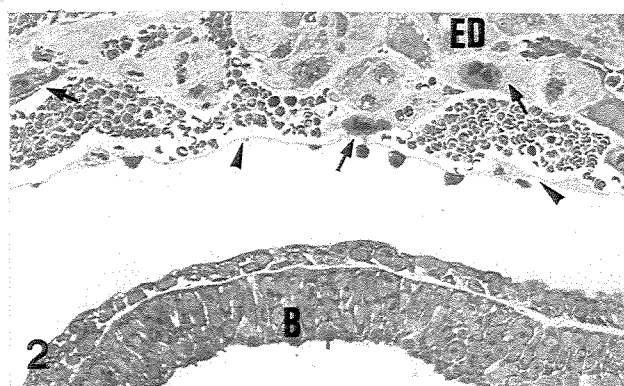
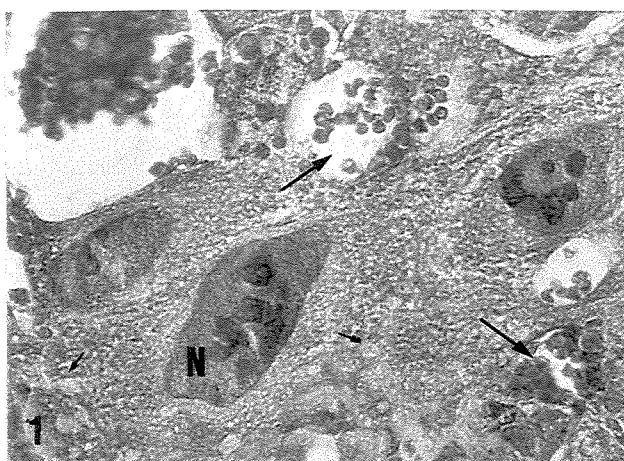


Figura 7: Fotomicrografia mostrando o aspecto geral da placenta de 13^o ddg. Observar as CTGs (setas) alinhadas na interface com as células decíduais. Notar a definição da camada do espôngio-trofoblasto (E), do labirinto (L) contendo tecido mesenquimal e (VM) vaso sanguíneo materno. A chave mostra a região da abóbada da placenta e o asterisco a borda placentária. Corte de parafina, HE, 50x.

Figura 8: Fotomicrografia em detalhe da interface materno-fetal da região da abóbada placentária no 13^o ddg. Observar as CTGs de formato irregular (setas), em íntimo contato com as células decíduais (D) e seus prolongamentos penetrando no leito vascular materno (cabeças de seta) Observar as vesículas no interior citoplasmático das CTGs (setas menores). Abaixo das CTGs estão as células do espôngio-trofoblasto (E) e o labirinto (L). Corte de parafina, HE, 360x.

Figura 9: Fotomicrografia das CTGs da região da abóbada placentária no 15^o ddg. Observar os prolongamentos citoplasmáticos das CTGs (setas) entre as células decíduais e revestindo a luz de vasos sanguíneos maternos (VM). Algumas células próximas às CTGs mostram sinais de degeneração (*). Corte semifino de Epon, corado com azul de toluidina, 760x.

Figura 10: Fotomicrografia mostrando o aspecto geral da placenta de 15^o ddg. CTGs aparentemente em camadas descontínuas (setas) delimita a interface entre a decídua basalis (D). Espôngio-trofoblasto (E); camada do labirinto (L). Observar que o conteúdo dos vasos sanguíneos maternos (VM) e do labirinto foram removidos pela perfusão. Corte de parafina, HE, 180x.

Figura 11: Fotomicrografia mostrando o detalhe da região da abóbada placentária de 18^o ddg. Observe as CTGs entre as células decíduais (setas) e um grupo de células da decídua em degeneração justapostas às CTGs (*). Decídua (D), espôngio-trofoblasto (E), labirinto (L). Corte de parafina, HE, 360x.

Figura 12: Fotomicrografia mostrando o aspecto da borda da placenta de 18^o ddg. Observe as CTGs bastante achatadas (setas) e muito próximas ao miométrio (M). Espôngio-trofoblasto (E), e labirinto (L) Corte de parafina, HE, 360x.

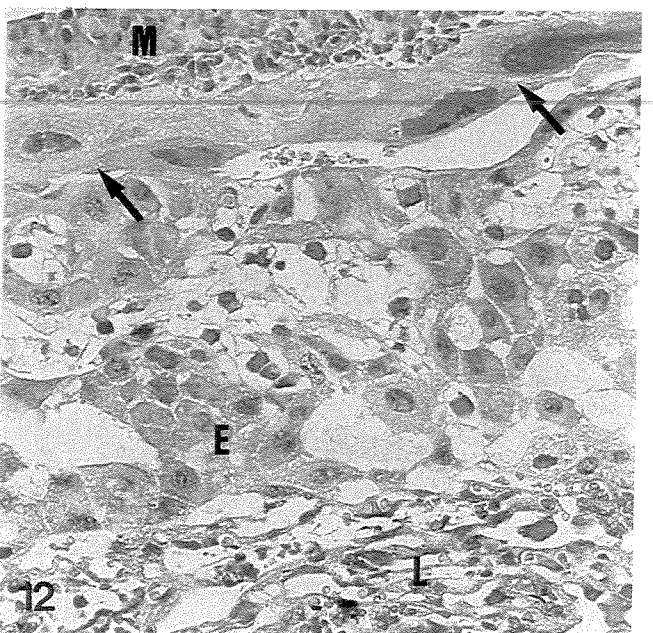
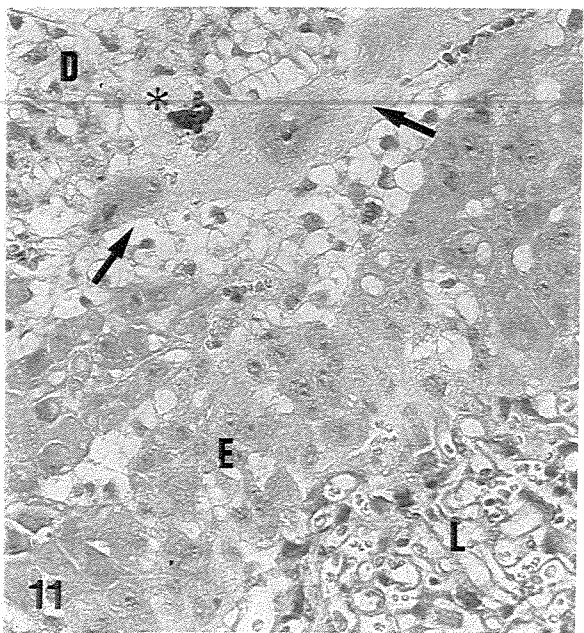
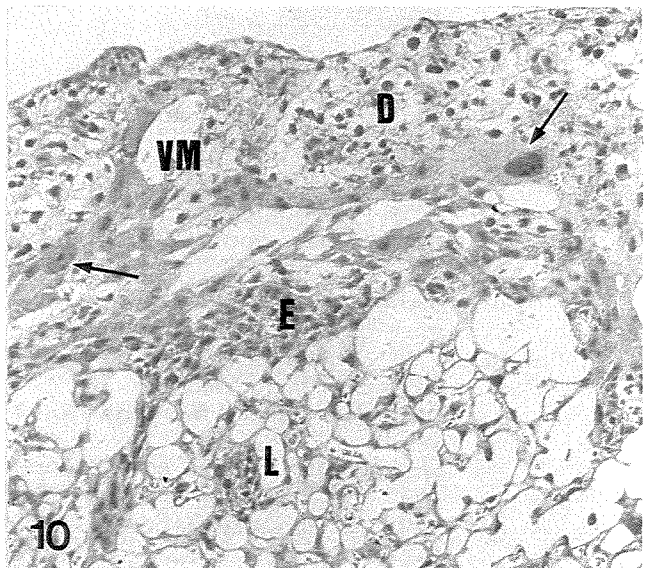
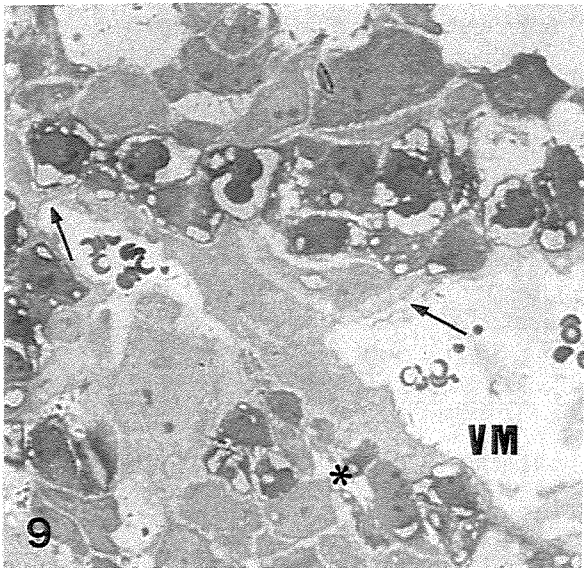
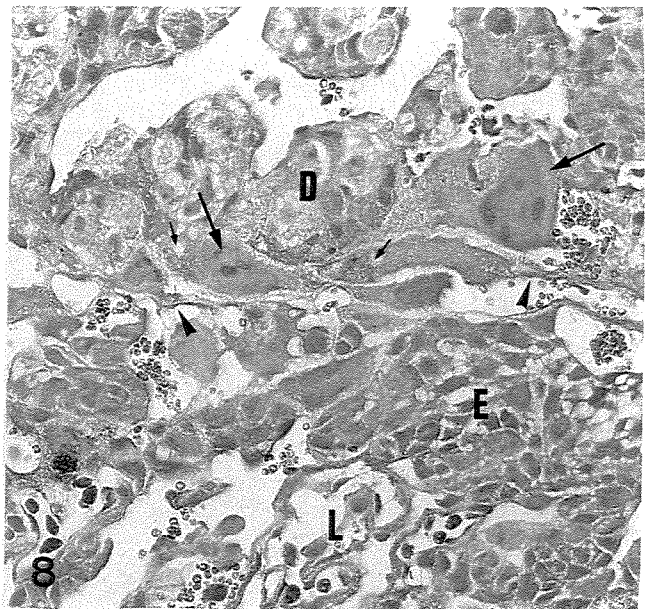
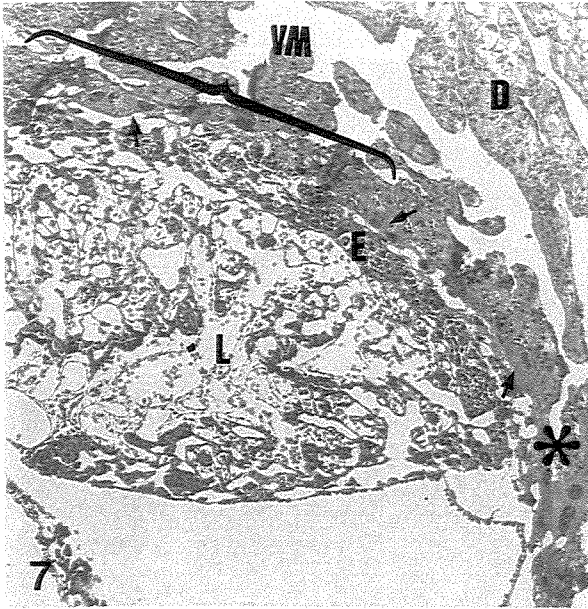


Figura 13: Micrografia eletrônica mostrando o citoplasma de uma CTG no 13º ddg.

Observar as mitocôndrias tubulares (M), complexo de Golgi (CG), lisossomas (L), microfilamentos (setas), o retículo endoplasmático granular, e os ribossomas e polissomas livres. Notar as junções do tipo desmossoma entre células contíguas e microvilos irregulares na superfície. Corte de Epon, 6840x.

Figura 14: Micrografia eletrônica de uma CTG do 11º ddg encontrada na região de interface. Observe o fagossoma (*) contendo restos celulares e no espaço extracelular células em degeneração (setas) e fibrina (★). Mitocôndria (M), retículo endoplasmático rugoso e junção do tipo aderente (cabeças de seta). Corte de Epon, 32000x.

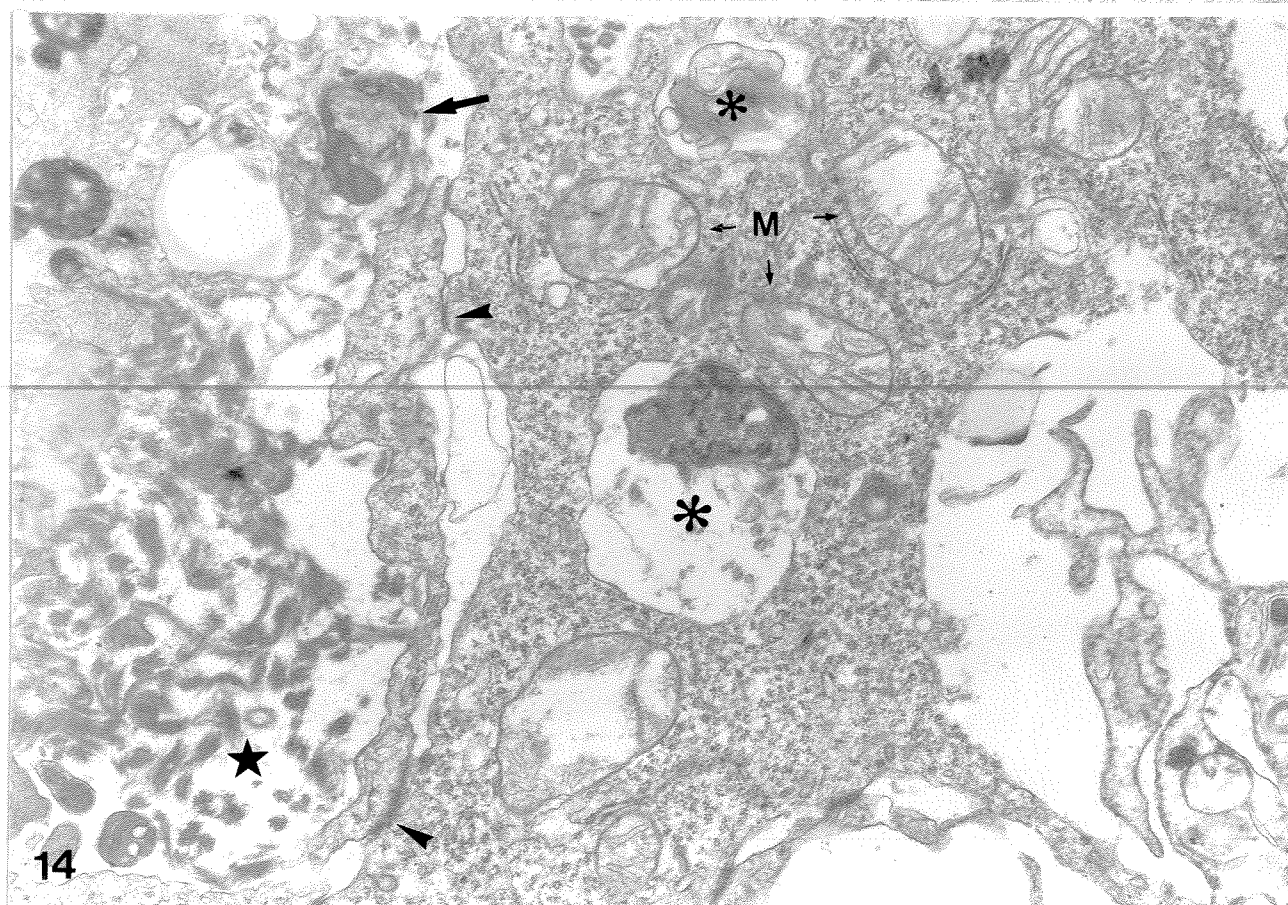
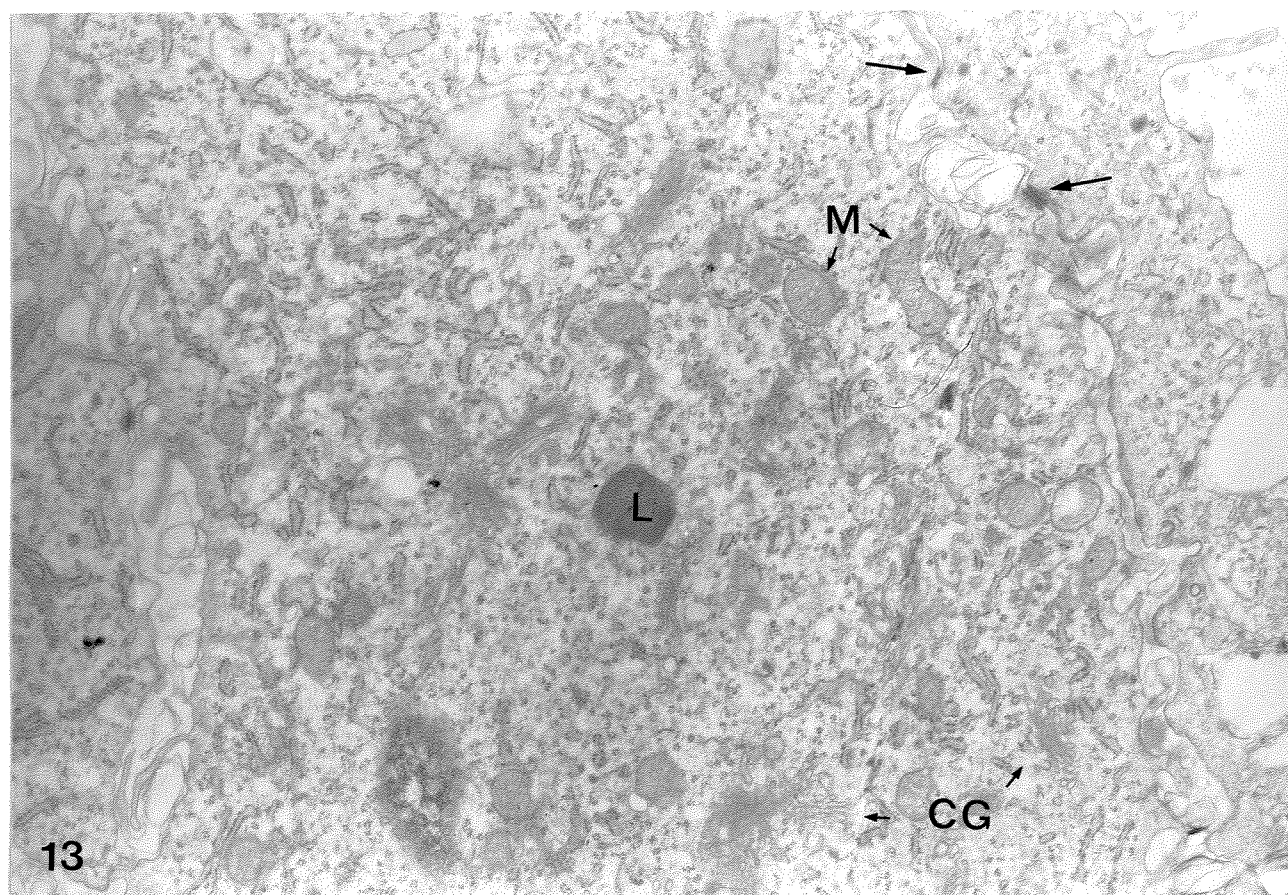


Figura 15: Micrografia eletrônica mostrando aspectos da frente de invasão das CTGs junto ao tecido materno no 13º ddg. Observar os prolongamentos citoplasmáticos da CTG invadindo o estroma decidualizado. Observe o fagossoma no interior do prolongamento citoplasmático da CTG (*) e a célula decidual confinada num compartimento em adiantado estado de degeneração (★). Mitocôndria (M) e junções do tipo aderente (setas). Corte de Epon, 13700x.

Figura 16: Micrografia eletrônica mostrando uma CTG de 18º ddg contendo fagossomas em seu interior (*) e a célula endometrial (EN) justaposta aparentemente sem qualquer sinal de degeneração. Núcleo (N). Corte de Epon 10600x.

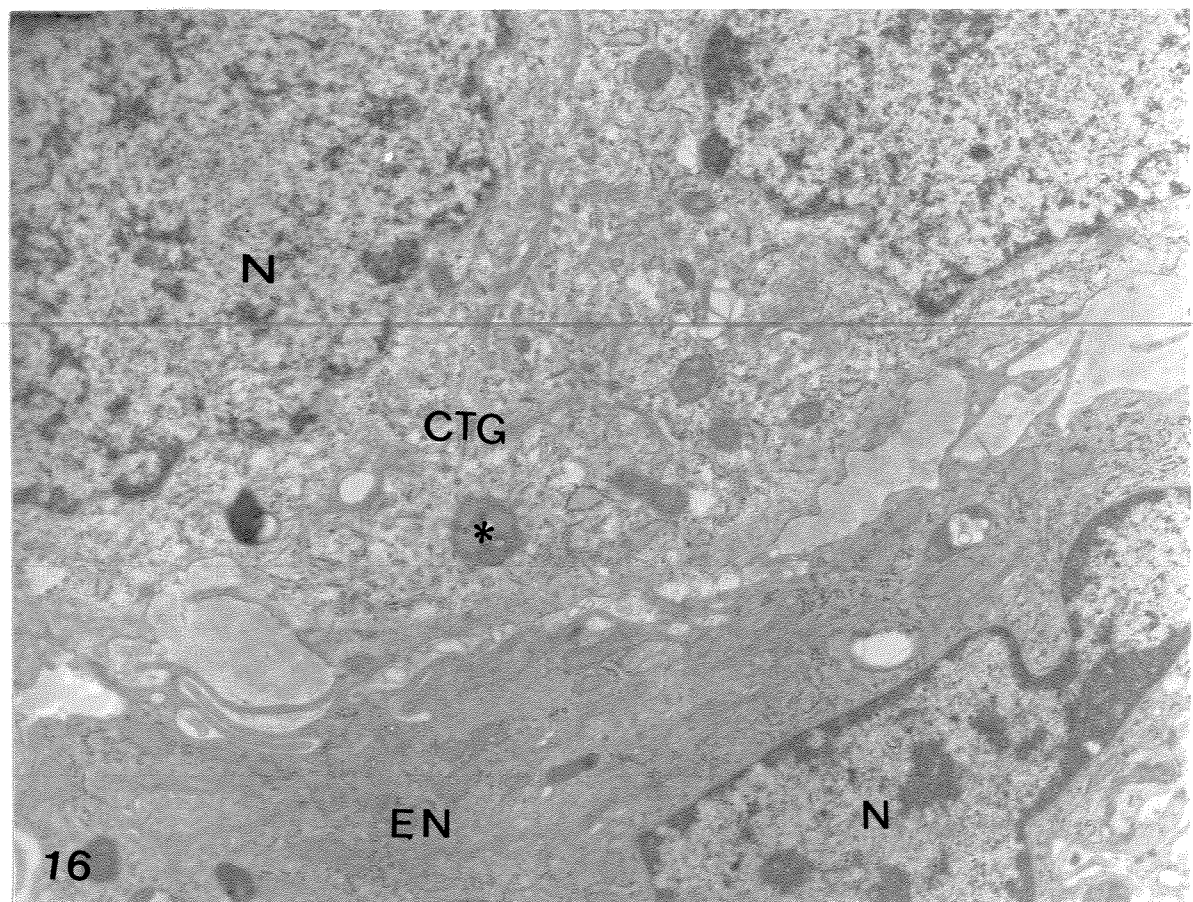
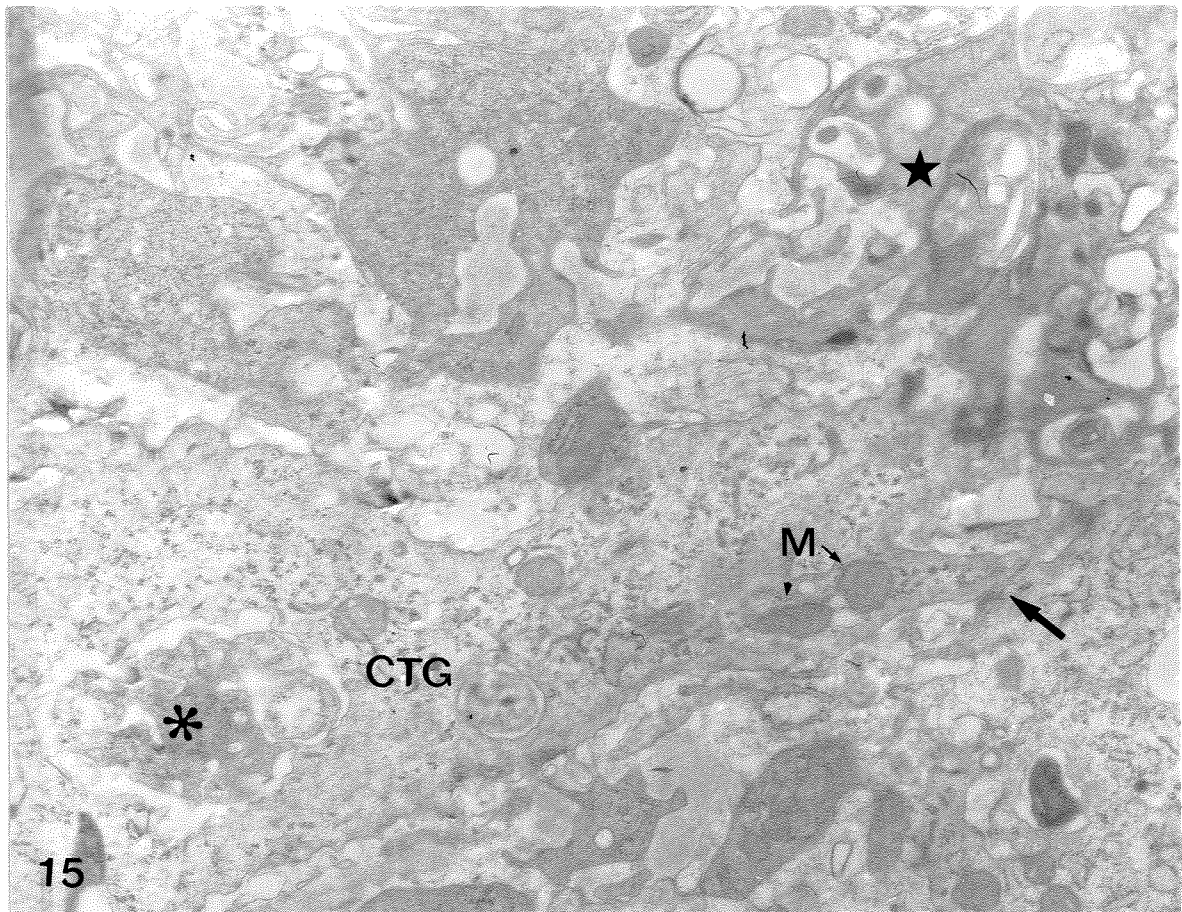


Figura 17: Fotomicrografia de imunofluorescência para anticatapsina D no 9º ddg, mostrando intensa positividade na região do cone ectoplacentário e para as CTGs (cabeças de seta) presentes no perímetro do blastocisto. O endométrio (E) também apresenta células com reação positiva. Blastocisto (B). 280x.

Figura 18: Fotomicrografia de imunofluorescência para anticatapsina B no 8º ddg mostrando positividade nas células do cone ectoplacentário e nas CTGs (cabeças de seta). 560x.

Figura 19: Fotomicrografia mostrando imunofluorescência positiva para anticatapsina D no labirinto-trofoblasto do 15º ddg. Notar o aspecto difuso da marcação. 560x.

Figura 20: Fotomicrografia de imunoperoxidase no 9º ddg mostrando CTGs da região mural do blastocisto (setas) intensamente positivas para anticatapsina D e as células decidualizadas (ED) próximo às CTGs fracamente positivas. Corte de congelação, contrastado com verde de metila, 560x.

Figura 21: Fotomicrografia de imunoperoxidase do 15º ddg mostrando a camada do labirinto-trofoblasto positiva para anticatapsina D. Notar o aspecto difuso da marcação. Corte de congelação, contrastado com verde de metila, 720x.

Figura 22: Fotomicrografia em detalhe de imunoperoxidase no 13º ddg mostrando CTGs da borda da placenta (setas) com reação positiva para anticatapsina D. Corte de congelação contracorado com verde de metila, 720x.

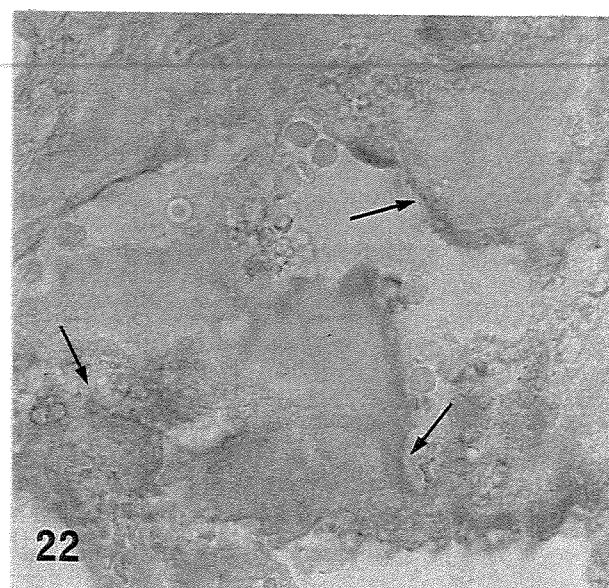
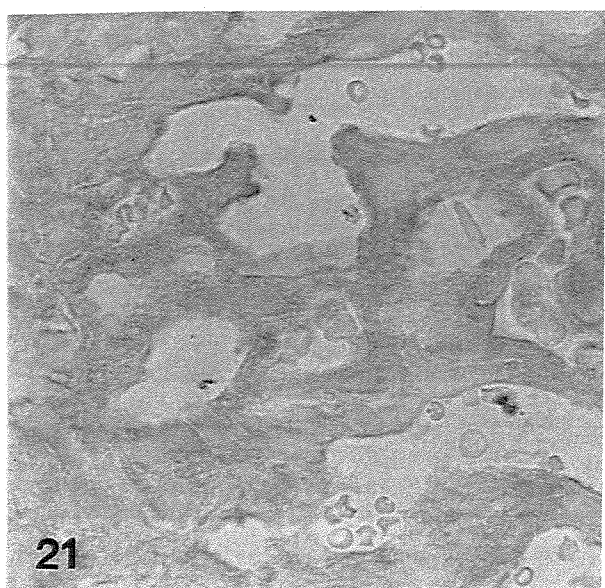
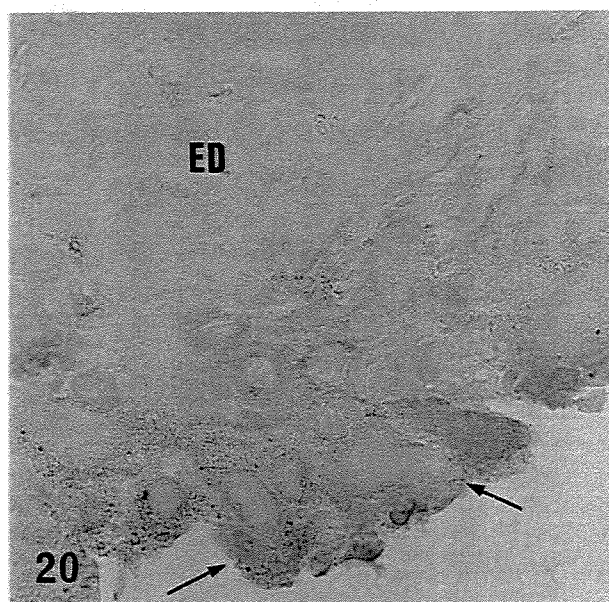
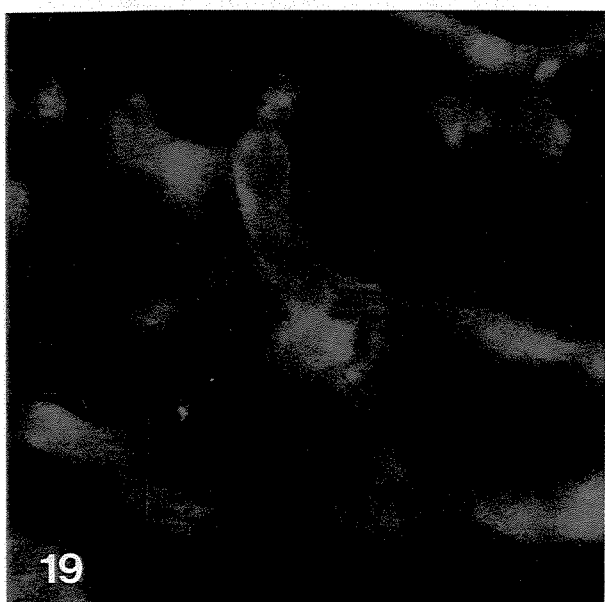
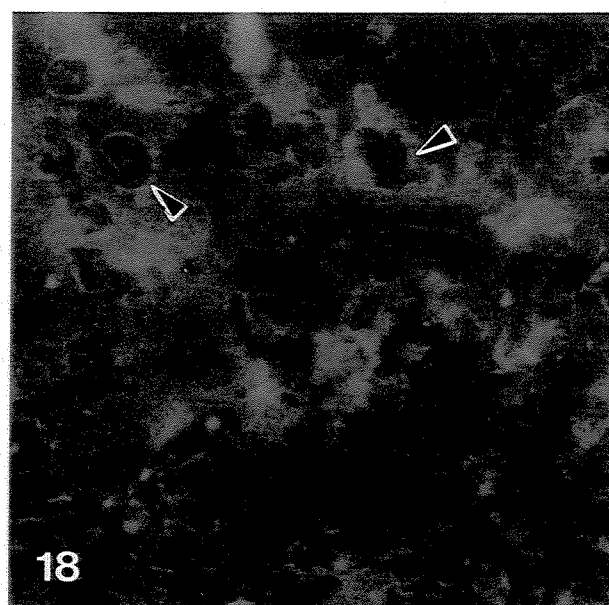
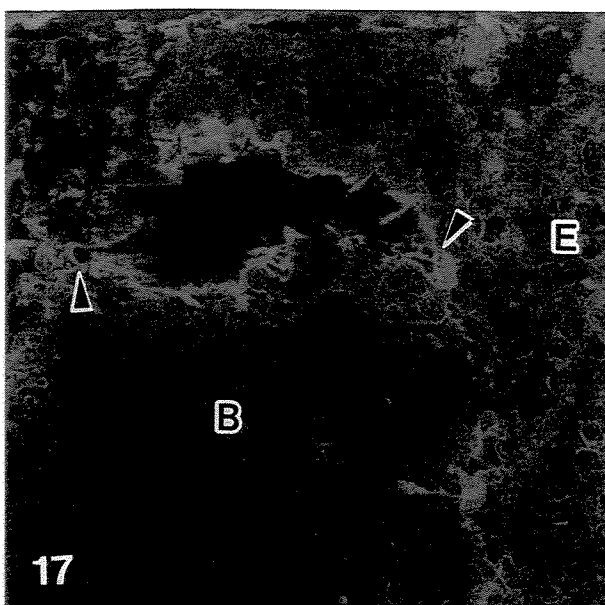


Figura 23: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando CTGs da região mural do 11º ddg positivas para catepsina D. Notar a distribuição dos sítios imunoreativos no citoplasma das CTGs e nos seus prolongamentos citoplasmáticos (setas). Observe a intensa marcação em padrão granular de diferentes tamanhos no citoplasma das CTGs (cabeças de seta) e a positividade sobre o conjunto de células em degeneração (*) junto às CTGs. Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 560x.

Figura 24: Fotomicrografia de reação imunocitoquímica para a anticatsina D na região do cone ectoplacentário (CEP) no 8º ddg. Observe a intensa reação nas células trofoblásticas do cone (setas) e a tonalidade acastanhada nos restos celulares e hemácias que mascaram as reações específicas. Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 320x.

Figura 25: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando CTGs (setas) com reação positiva para a anticatsina D na região da abóbada placentária de 15º ddg. Observe a reação positiva difusa nas células do labirinto (cabeças de seta). Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 320x.

Figura 26: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando reação positiva para a anticatsina D nas CTGs presentes nas bordas das placentas no 13º ddg (setas). As células granulosas metriais também apresentam reações positivas nos seus grânulos (cabeças de seta). Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 320x.

Figura 27: Fotomicrografia mostrando o controle negativo da reação de imunoperoxidase. Observe as células trofoblásticas da região do cone totalmente negativas (*) e reação de fundo inespecífica sobre as hemácias. Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 320x.

Figura 28: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando um corte de rim de camundongo com reações positivas para a anticatsina D nas células dos túbulos coletores (setas) e negativa nos corpúsculos renais (*). Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 180x.

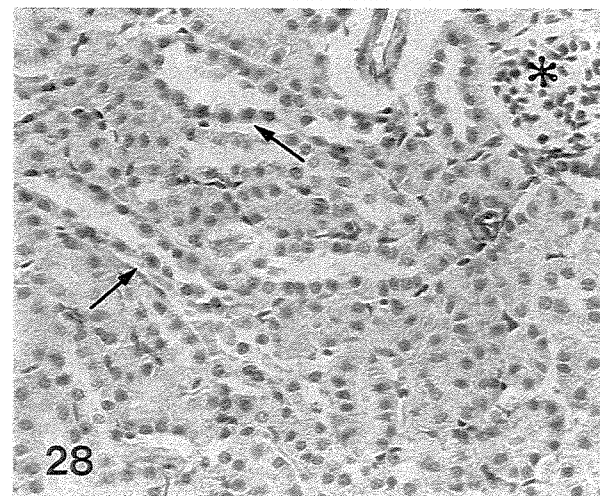
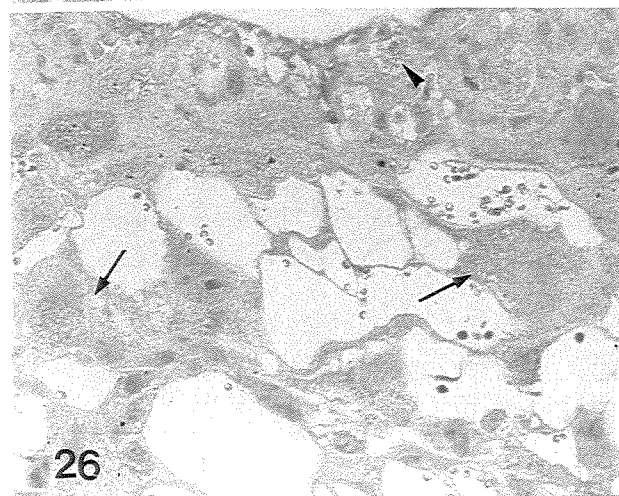
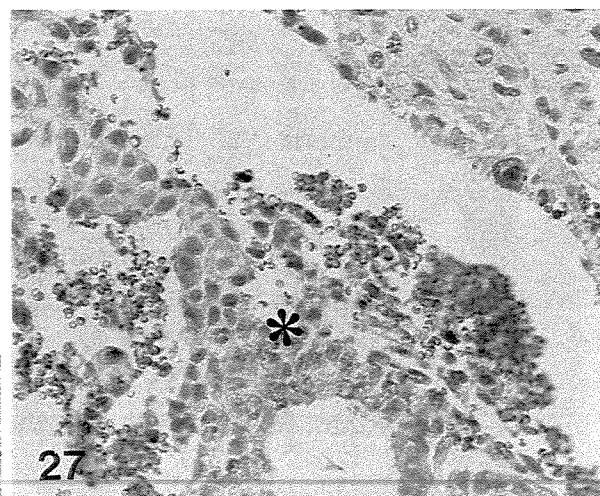
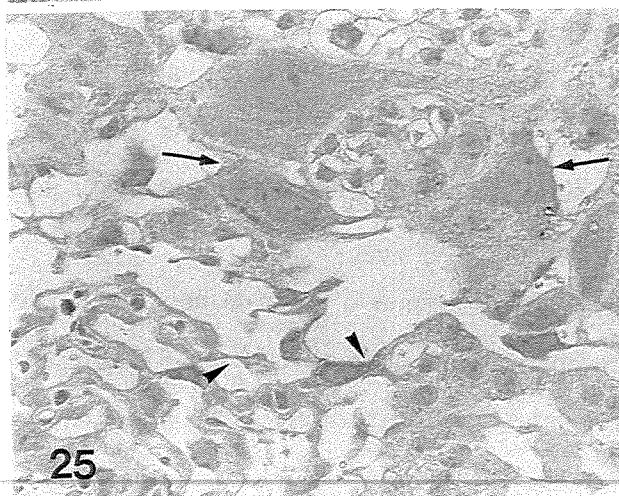
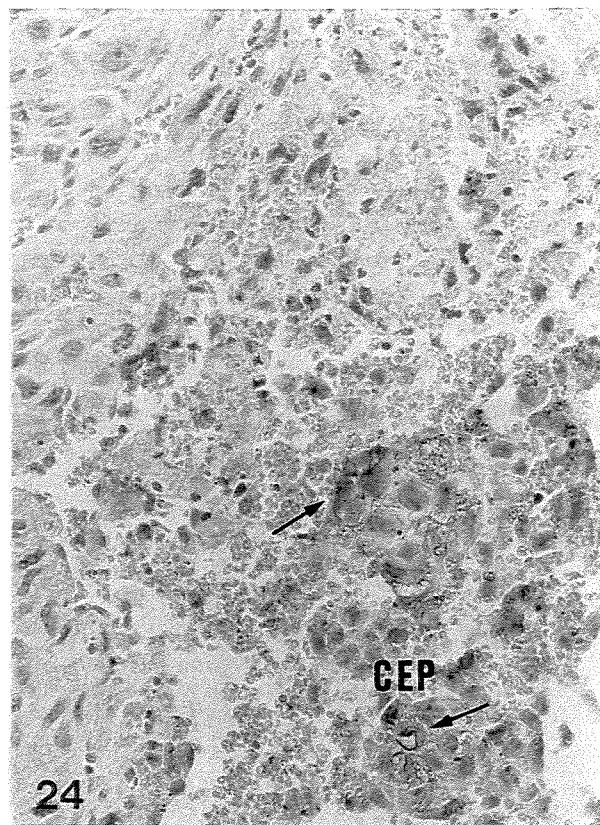
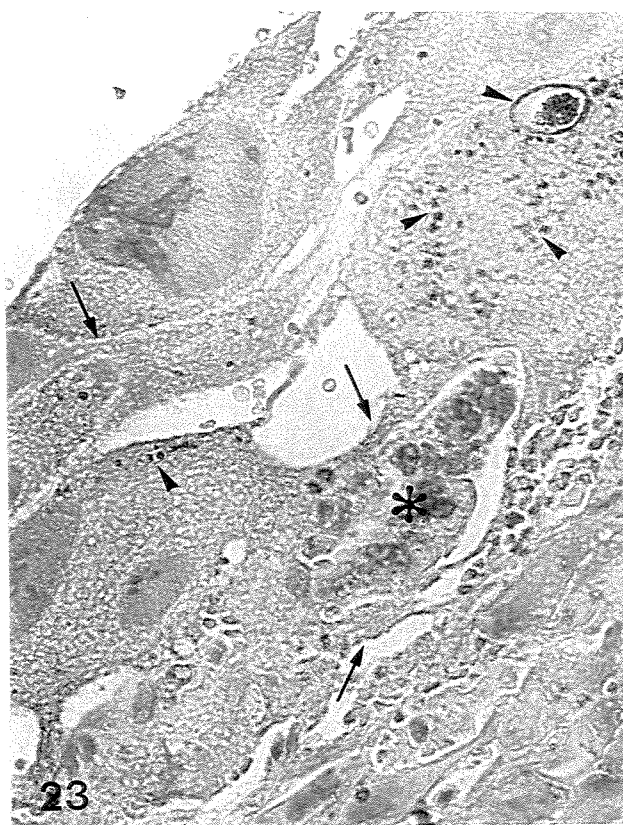


Figura 29: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando detalhes da reação positiva para a anticatapsina B no 15º ddg. Observe a reação positiva presente no interior das CTGs (setas) e em algumas células decíduais (cabeças de seta). Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 560x.

Figura 30: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando reação positiva para a anticatapsina B em uma CTG ao lado de outras aparentemente negativas da região mural do embrião de 9º ddg. Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 560x.

Figura 31: Fotomicrografia de imunoperoxidase da placenta de 18º ddg mostrando reação positiva para a anticatapsina B. Observe a reação positiva de aspecto puntiforme no interior das CTGs (setas), e das células do espôngio-trofoblasto (cabeça de seta). As células decíduais também apresentam reações positivas (*). Corte de parafina, DAB/ hematoxilina, 320x.

Figura 32: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando o controle negativo do 8º ddg. Observe as CTGs da região abembrionária negativas (setas) e a intensa reação de fundo sobre as hemácias. Corte de parafina DAB/hematoxilina, 320x.

Figura 33: Fotomicrografia de imunoperoxidase mostrando um corte de rim de camundongo com reações positivas para a anticatapsina B no interior das células dos túbulos contorcidos proximais (setas). Corte de parafina, DAB/hematoxilina. 720x.

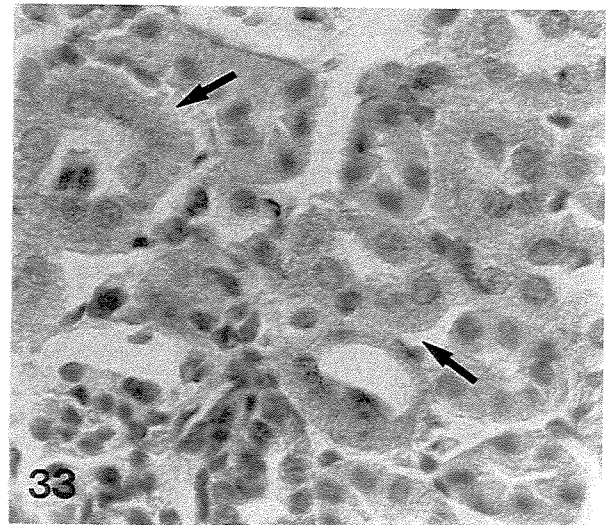
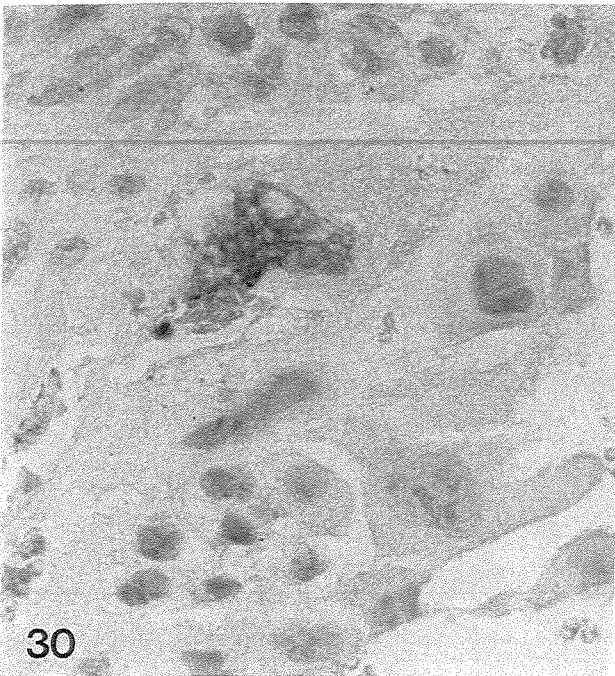
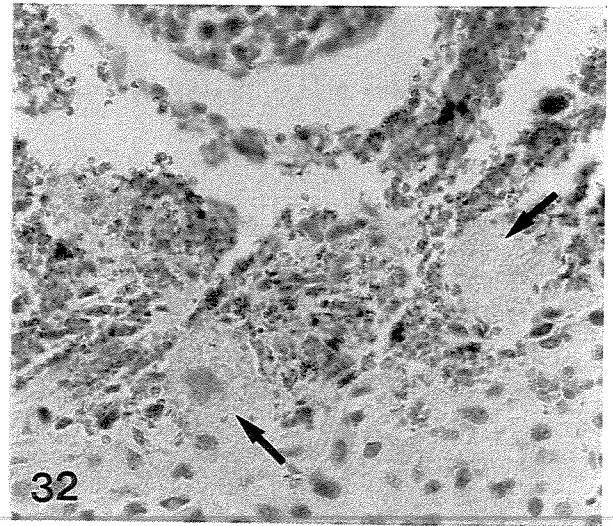
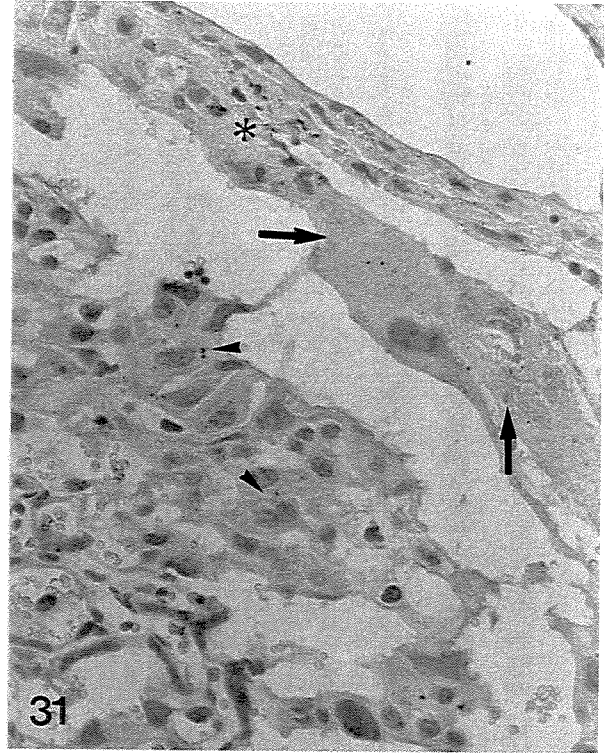
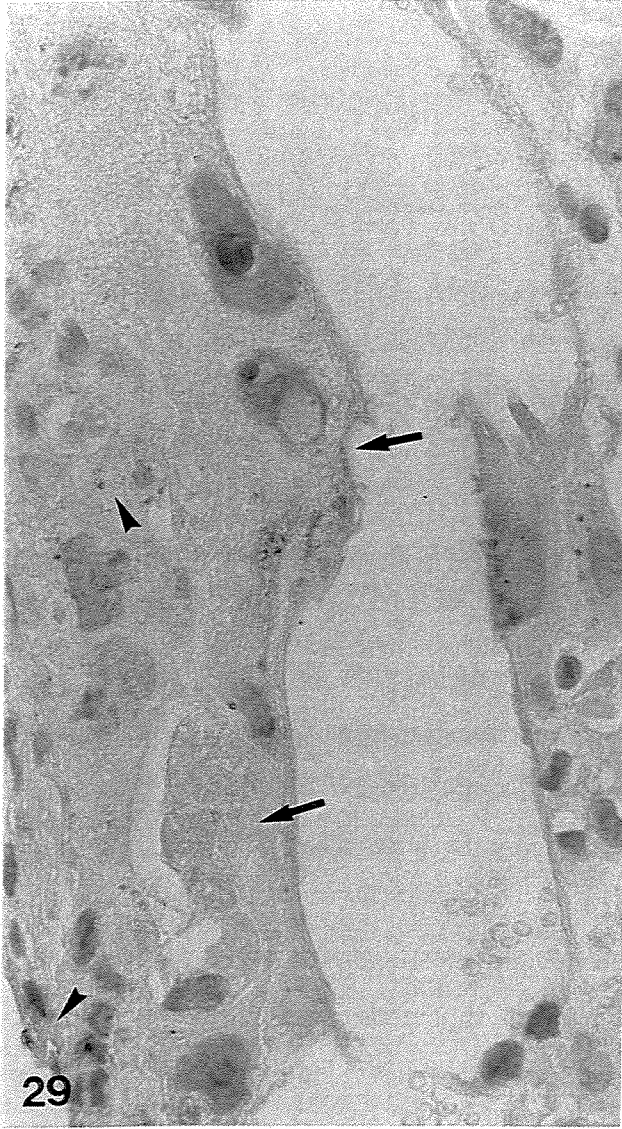


Figura 34: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as células trofoblásticas da região do cone ectoplacentário positivas para a anticatapsina D (*). Endométrio (ED) e blastocisto (B). Corte de parafina. 180x.

Figura 35: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as CTGs da região mural do embrião de 11º ddg positivas para a anticatapsina D. Observe no interior das CTGs o contorno de vesículas negativas (cabeças de seta). Corte de parafina. 720x.

Figura 36: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as CTGs da borda da placenta de 15º ddg positivas para a anticatapsina D. Observe além da fluorescência difusa, o padrão puntiforme de positividade tanto para as CTGs (setas) como para as células labirínticas (cabeças de seta) e as hemácias negativas. Corte de parafina. 720x.

Figura 37: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando um corte de rim de camundongo com reações positivas para a anticatapsina D nas células dos túbulos coletores (setas). Corte de parafina, 180x.

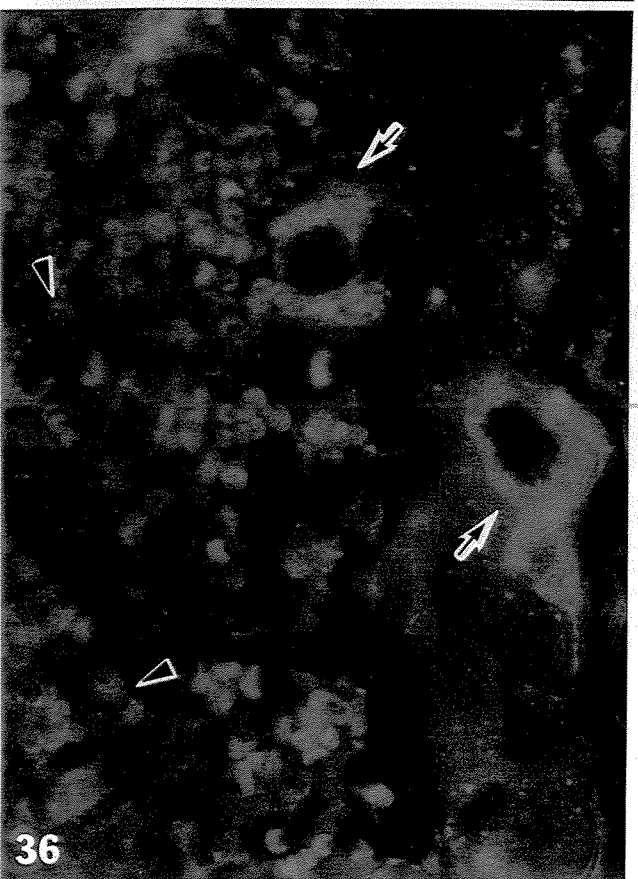
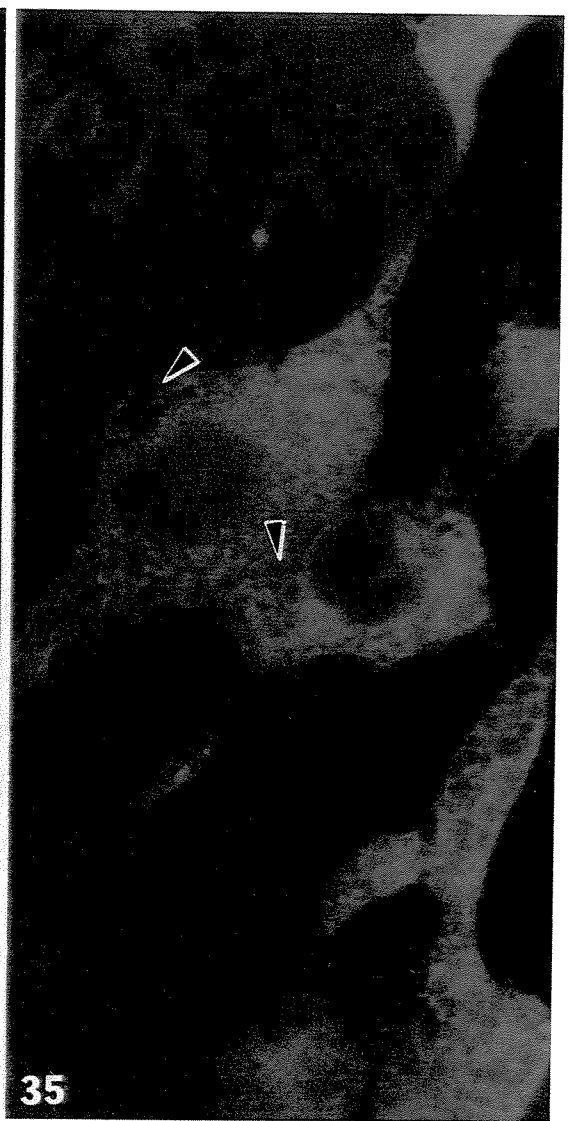
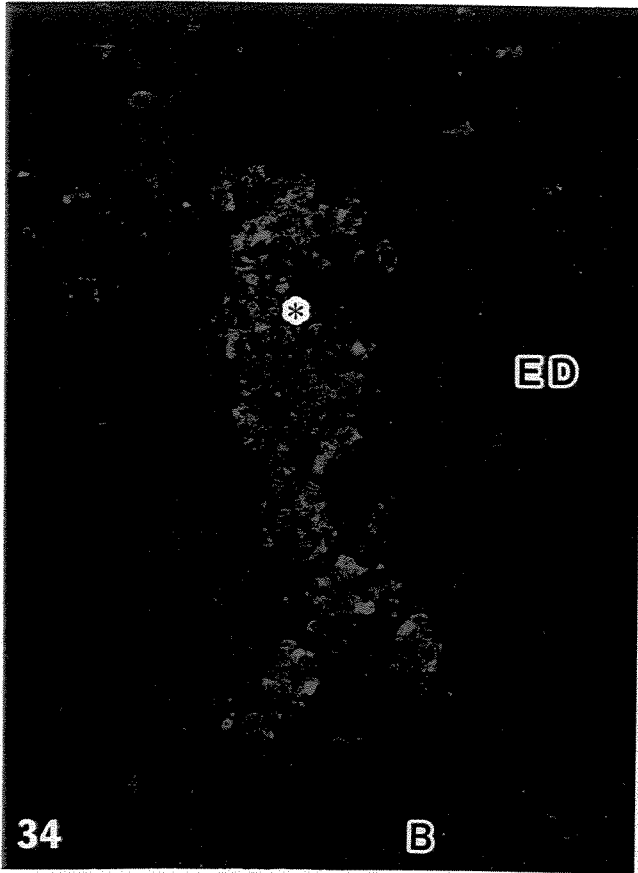


Figura 38: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as células trofoblásticas da região do cone ectoplacentário positivas para a anticatepsina B. Endométrio (ED) Corte de parafina. 320x.

Figura 39: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as CTGs da região mural do embrião de 13º ddg positivas para a anticatepsina B. Observe as hemáceas negativas. Corte de parafina. 720x.

Figura 40: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando as CTGs da borda da placenta de 11º ddg positivas para a anticatepsina D. Observe as áreas com intensa fluorescência no interior das CTGs (setas). Corte de parafina. 720x.

Figura 41: Fotomicrografia de imunofluorescência mostrando um corte de rim de camundongo com reações positivas para a anticatepsina B no interior dos túbulos proximais (setas). Corte de parafina, 180x.

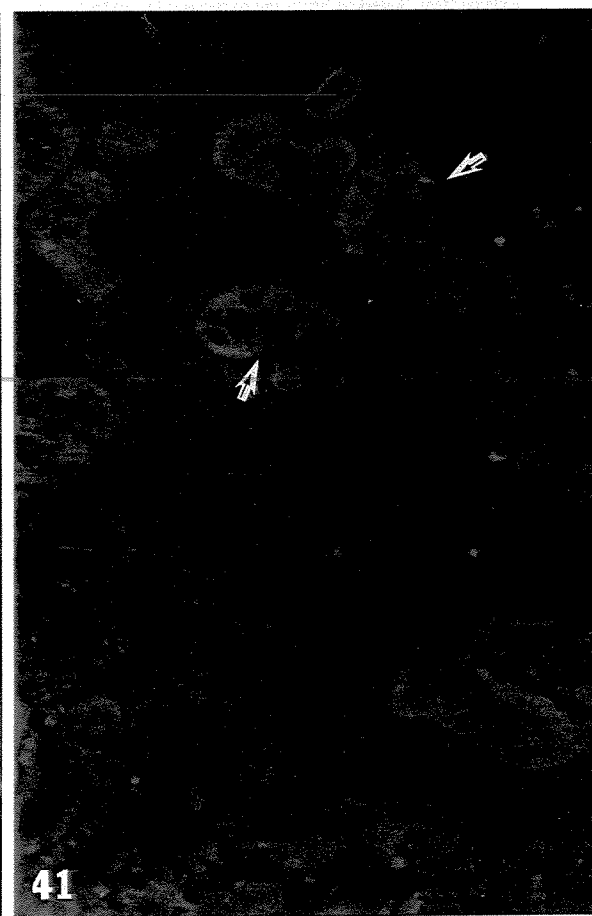
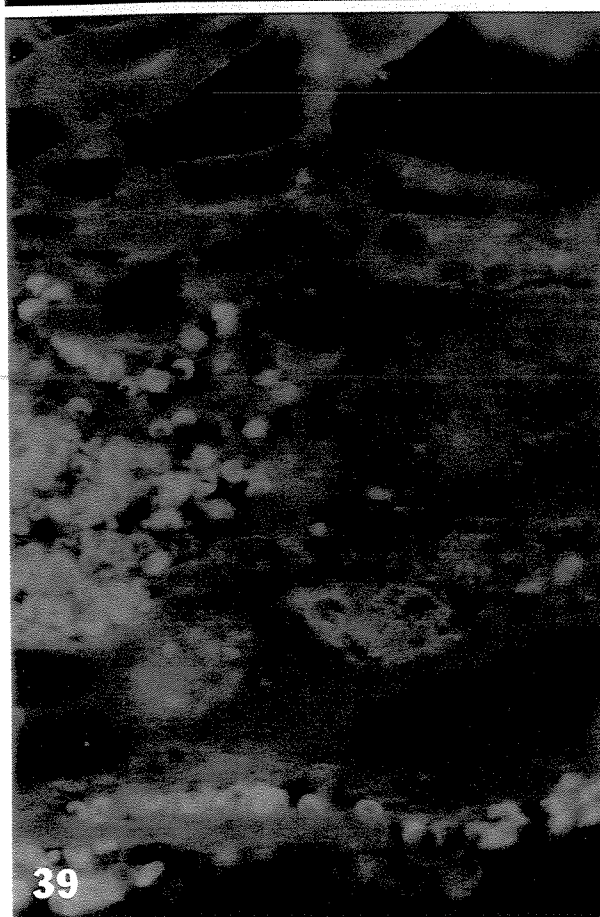
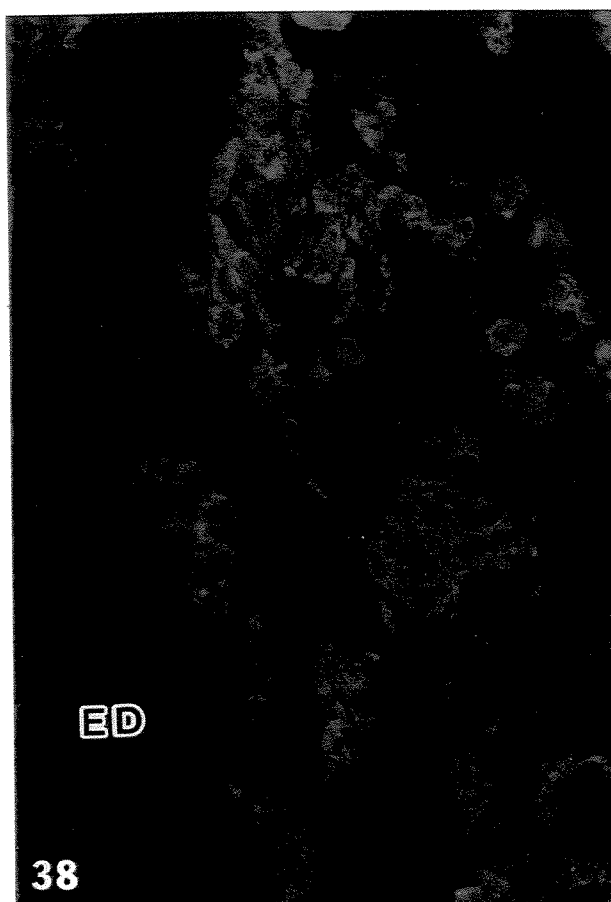


Figura 42: Eletromicrografia da imunomarcacão para a anticatapsina D em CTGs de 13^o ddg. Observar as partículas eletrondensas de ouro depositadas sobre os lisossomas. Corte de LR-White, 11500x.

Figura 43: Eletromicrografia de imunomarcacão com proteína A-gold para anticatapsina D. Notar a intensa marcaco sobre fagossomas de uma CTG de 11^o ddg, Corte de LR-White, 23700x

Figura 44: Eletromicrografia para catapsina D mostrando partículas de ouro no espaço intercelular entre duas CTGs Corte de LR-White, 6800x.

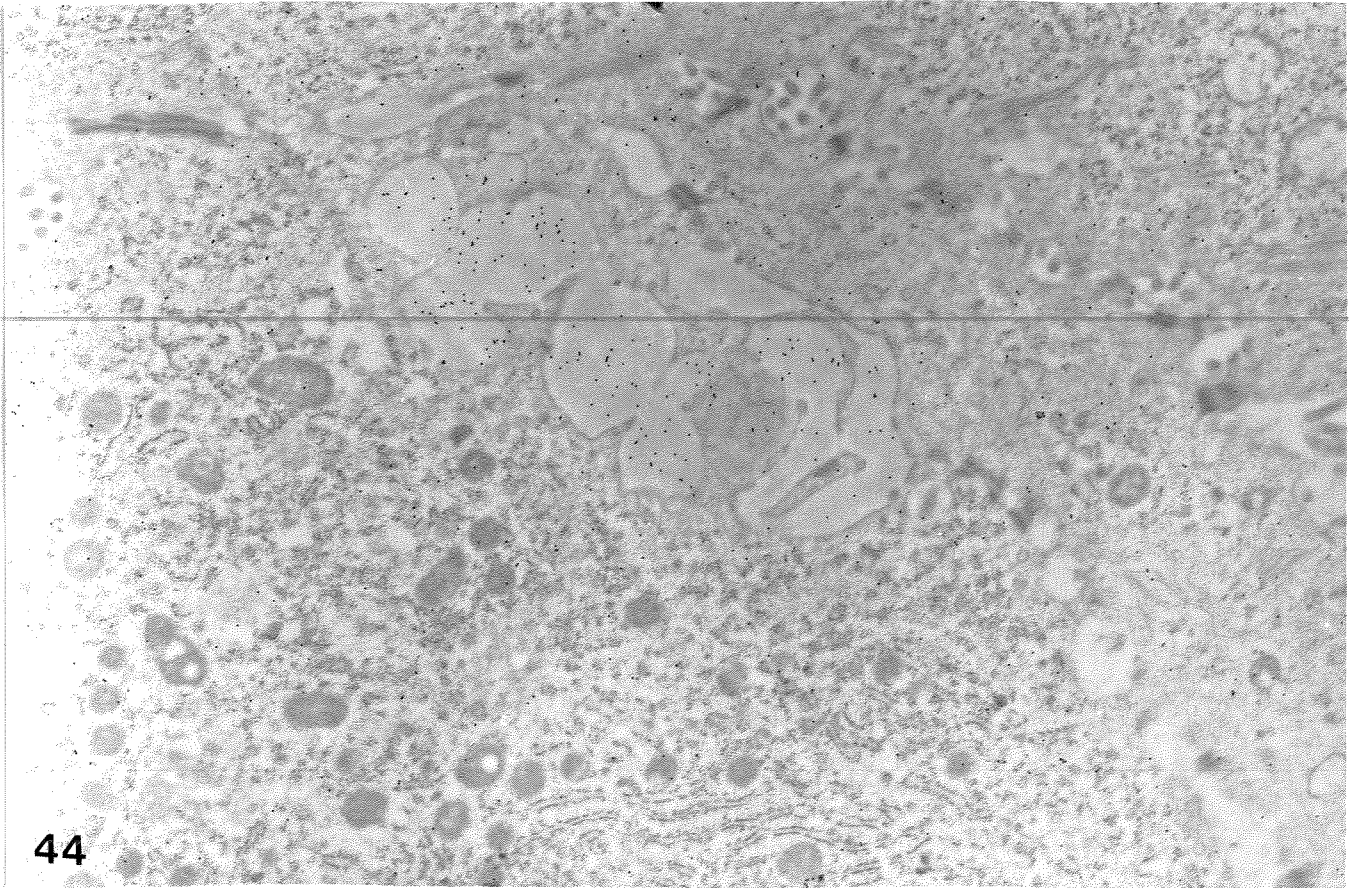
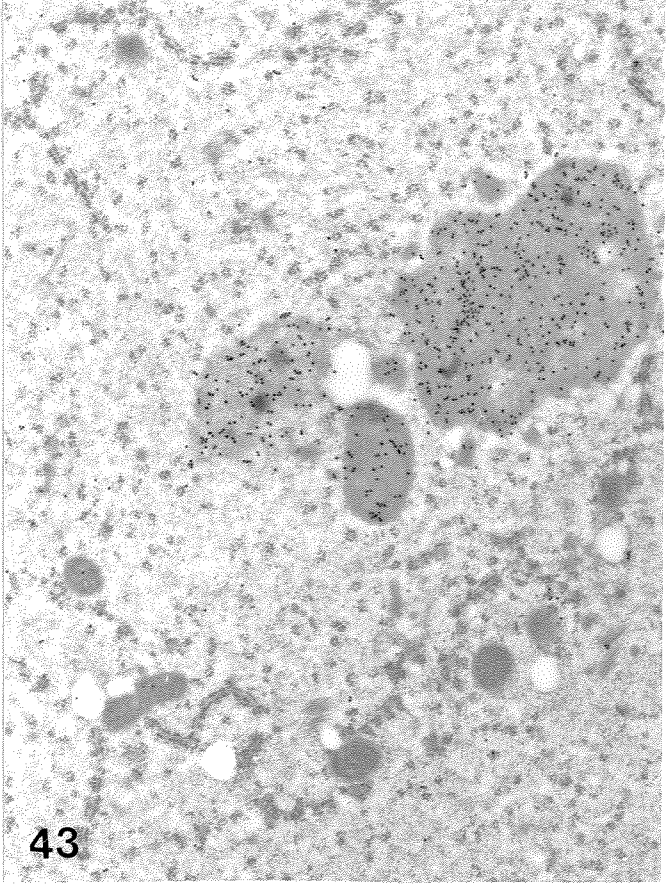
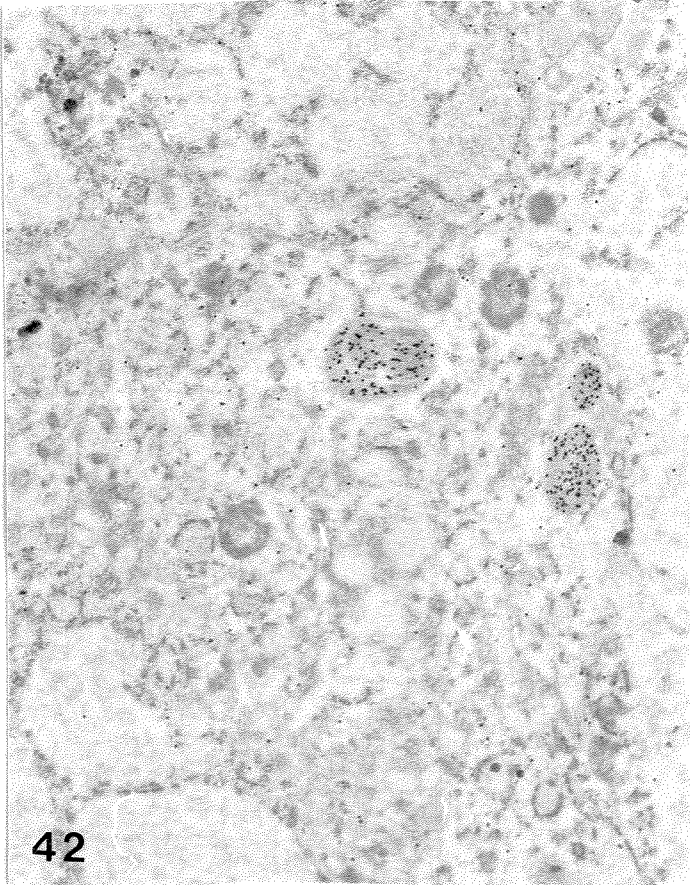
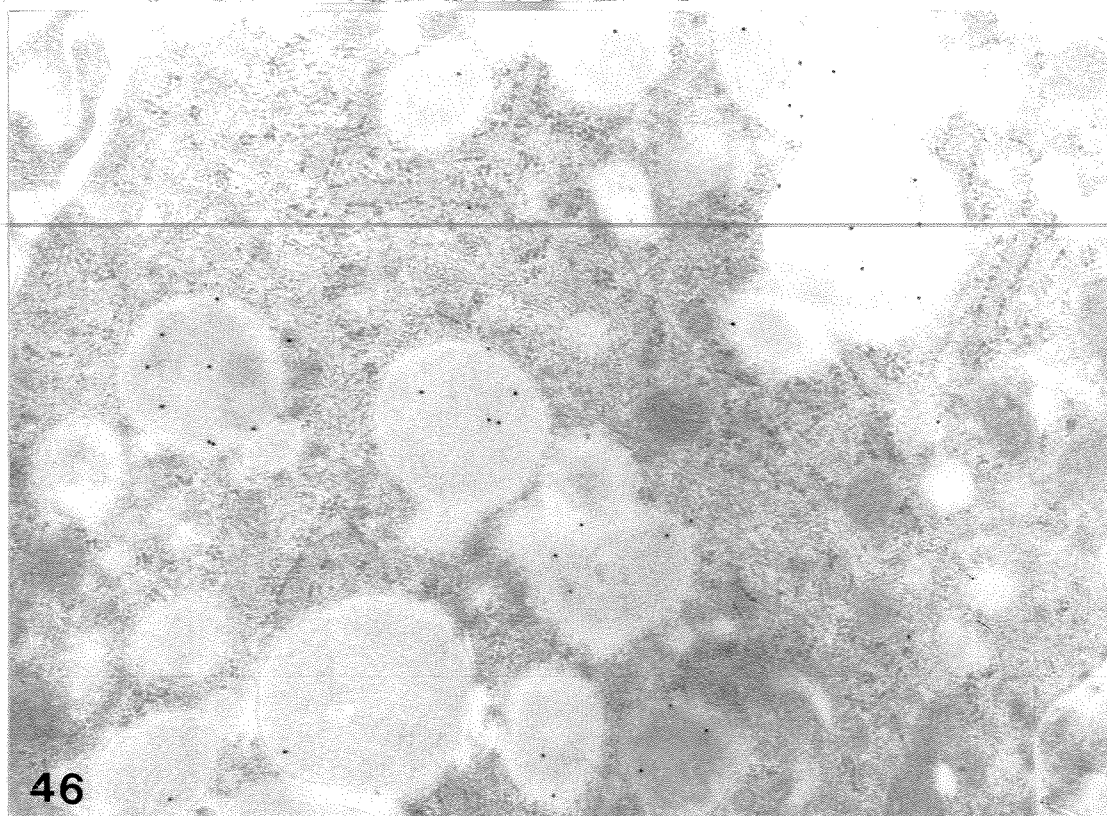
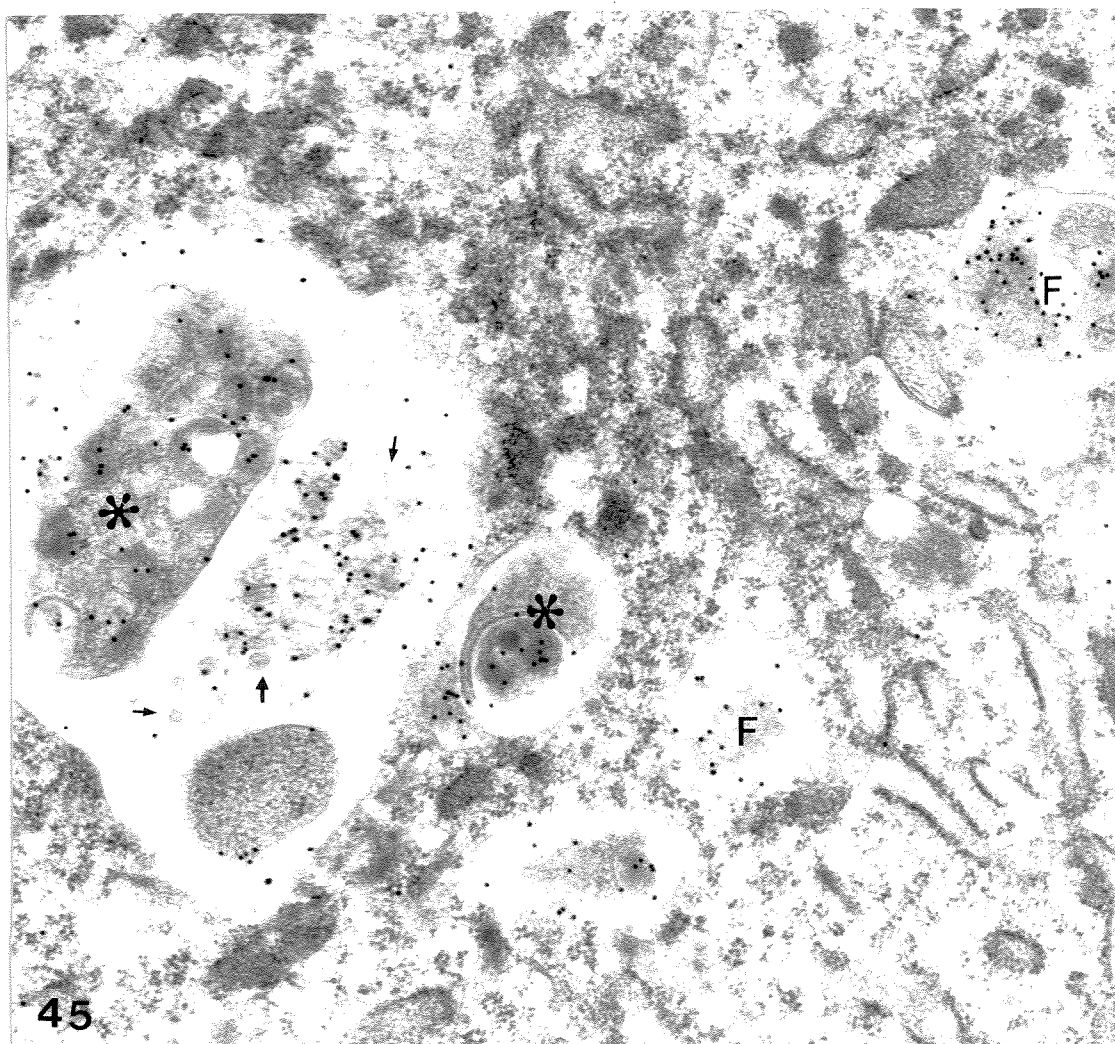


Figura 45: Micrografia eletrônica para anticatapsina D mostrando em detalhes partículas de ouro em um compartimento extracelular contendo fragmento da célula decidual (*) e fibrilas colágenas (setas), 9º ddg. Fagossomas (F) Corte de LR-White, 63000x.

Figura 46: Eletronmicrografia da imunomarcção para catepsina B em CTG de 15º ddg mostrando partículas de ouro sobre os lisossomas. Corte de LR-White, 45000x.



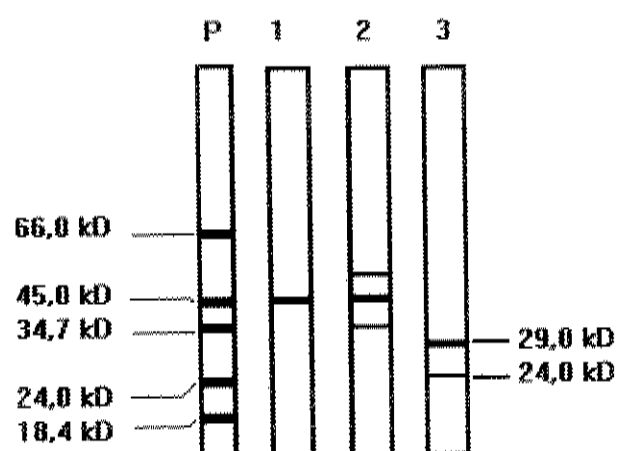


Figura 47 - Padrão do SDS-PAGE com gel em gradiente de 12,5-17,5% e “western-blotting” obtido em homogeneizados de placentas de 13^o ddg. **P** - padrão de peso molecular SDS-MW70 contendo albumina bovina (66k D), albumina de ovo (45 kD), pepsina (34,7 kD), tripsina (24 kD), B-lactoglobulina (18,4 kD); **1**- Catapsina D de baço bovino - 45 kD (Sigma, St Louis, USA); **2** e **3**- padrão de imunoreação para anticatapsina D (52 kD, 45 kD e 34k D) e B (29 kD e 24 kD) respectivamente.

7 - DISCUSSÃO

As células trofoblásticas gigantes (CTGs) de camundongos têm sido descritas como sendo células hipertróficas que podem atingir até 300µm de diâmetro, com um núcleo proeminente onde predomina a cromatina pouco condensada, apresentando um ou mais nucléolos evidentes e um contorno celular irregular, devido aos inúmeros prolongamentos citoplasmáticos que freqüentemente unem-se aos de CTGs adjacentes, confinando espaços intercelulares ocupados por células sangüíneas ou endometriais (Müntener & Hsu, 1977; Ilgren, 1981; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989). Tais características também foram encontradas nos materiais analisados no presente trabalho e compuseram os parâmetros de referência para a identificação e localização das CTGs nos diversos estádios que abrangeram o nosso estudo.

Em nossas observações as CTGs foram invariavelmente encontradas ao longo de toda a extensão da interface entre o tecido materno e o fetal (perímetro embrionário e placentário), com algumas peculiaridades morfológicas relacionadas com a localização e/ou período gestacional analisado.

Desde as fases pré-placentárias, as CTGs encontradas ao redor de todo o perímetro do embrião e do cone ectoplacentário (CEP) organizavam-se em rede através de junções de seus prolongamentos citoplasmáticos, delimitando lacunas de formato e tamanhos variados. Estas lacunas também foram observadas entre as CTGs localizadas ao longo do perímetro das placentas até o 15º ddg.

O fato da grande maioria destas lacunas formadas pelas CTGs estarem preenchidas por células sangüíneas de origem materna, aliado à presença dos prolongamentos citoplasmáticos de CTGs insinuando-se entre as células decíduais e no interior dos vasos sangüíneos, caracteriza o comportamento hematotrófico destas células. Tal fato tem sido relatado também por Welsh & Enders (1985), que identificaram em ratos, as CTGs ou seus prolongamentos citoplasmáticos invadindo a decídua primária em direção aos vasos

sangüíneos. Ao atingi-los, estas células penetrariam no seu interior e passariam a revesti-los, removendo extensões variáveis do endotélio. Este processo ocasionaria o extravasamento sangüíneo para o interior das lacunas formadas pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs.

O hematotrofismo das CTGs tem sido evidenciado também nos experimentos de desenvolvimento ectópico das CTGs, onde o comportamento invasivo destas células seria facilitado ao atingir o leito vascular sangüíneo (Kirby, 1963; Yamada, 1990; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1991; Faria & Bevilacqua, 1995).

Alguns autores descrevem nesta fase pré-placentária a presença de uma microcirculação estabelecida entre o embrião e o tecido materno (Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989; Enders & Welsh, 1993).

Assim sendo, o sangue confinado no interior das lacunas formadas pelas CTGs, observado em nossos materiais, deve fazer parte dessa microcirculação. O fluxo sangüíneo dessa região deve ser extremamente lento, provavelmente não sendo impulsionado pela pressão arterial e conseqüentemente não sendo removido mesmo durante a perfusão da solução fixadora.

Enquanto a placenta ainda não está estabelecida, a presença do sangue materno entre as células trofoblásticas deve ser essencial para as trocas metabólicas entre o organismo materno e o embrião (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988), pois a nutrição embrionária seria dependente da troca de nutrientes possibilitada pela microcirculação (Billington, 1971; Welsh & Enders, 1987).

Esta microcirculação parece ser estabelecida também entre as CTGs localizadas na interface da placenta em formação. Isto é, até o momento em que as camadas da placenta estejam definidas e funcionalmente aptas para exercer as trocas metabólicas entre o sangue materno e fetal. Durante a organogênese da placenta, foram identificadas no seu perímetro externo CTGs e/ou seus prolongamentos, insinuando-se no interior de vasos sangüíneos maternos. Estas CTGs também estabelecem lacunas delimitadas pelos seus prolongamentos citoplasmáticos que são preenchidas por células sangüíneas. Tal aspecto

é evidente até o 13º ddg e gradualmente menos freqüente nos estágios mais avançados da placentação.

Conforme descrito nos resultados, a organização da placenta fetal com todas as suas camadas tornava-se evidente a partir do 13º ddg. Até então, a diferenciação e a organização da camada labiríntica, local onde ocorre a troca metabólica entre o sangue materno e o fetal, são insipientes. Como esta camada vai sendo incrementada gradualmente a partir do 13º ddg, é plausível estabelecer a importância das CTGs e dos seus compartimentos de microcirculação na manutenção e desenvolvimento fetal. No 15º ddg, a placenta fetal já possui sua forma definitiva e uma vez tendo atingido a sua plena capacidade de trocas metabólicas para suprir o crescimento fetal ao nível do labirinto, parece reduzir ou cessar o seu crescimento. A partir do 15º ddg, verificava-se ainda um aumento na espessura da camada labiríntica, porém sem o aumento significativo do volume total placentário. Na placenta considerada madura, do 18º ddg, as CTGs encontradas possuíam um formato mais alongado sem a profusão de lacunas formadas pelos seus prolongamentos citoplasmáticos.

As evidências acima sugerem que a microcirculação confinada às lacunas formadas entre as CTGs nas fases pré-placentárias e no início da placentação, daria, à medida que a camada labiríntica se organizava, continuidade aos seios sangüíneos formados nesta camada, favorecendo a circulação placentária de maior fluxo e eficiência.

Desta forma, até o início da segunda metade do período gestacional, a atividade invasiva das CTGs junto ao endométrio seria ditada primordialmente pelo seu hematotrofismo.

Outra característica morfológica peculiar, encontrada nas CTGs, foi a presença do grande número de vesículas intracitoplasmáticas, cujo conteúdo ao nível ultra-estrutural demonstrou ser de hemácias e restos celulares, provavelmente de origem endometrial. Tais achados confirmam a atividade fagocitária destas células, já amplamente descritas na literatura tanto para gestações normais (Billington, 1971; Schlafke e Enders, 1975; Katz & Abrahamsohn, 1987; Welsh & Enders, 1987, 1991; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988,

1989; Enders & Welsh, 1993; Ferro & Bevilacqua, 1994; Katz, 1995) como em desenvolvimentos ectópicos (Fawcett, 1950; Kirby, 1963; Yamada, 1990; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1991; Faria & Bevilacqua, 1995) e “in vitro” (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1994; Gaglioti, 1994; Gaglioti et al., 1995; Albieri & Bevilacqua, 1996).

Chamou a atenção, a proporção maior de fagossomas contendo eritrócitos, nas CTGs encontradas nas fases pré-placentárias, sugerindo uma atividade eritrofagocitária preferencial das CTGs nesta fase. Tal resultado corrobora com os descritos por Billington (1971), o qual atribuiu à esta atividade, uma grande importância na manutenção do embrião antes do estabelecimento da placenta. Tal hipótese tem sido sugerida também por Tachi et al. (1970) e Bevilacqua & Abrahamsohn (1988, 1989).

A partir do momento que a placenta estabelece um fluxo sanguíneo capaz de prover as trocas necessárias para o abastecimento embrionário, reduziria a grande necessidade de degradar localmente os componentes maternos para a manutenção embrionária. Este fato foi comprovado também em nossos resultados, onde nas CTGs encontradas em placentas já consolidadas, a quantidade de fagossomas contendo hemácias era substancialmente menor.

Por outro lado, a atividade fagocitária desempenhada pelas CTGs tem sido atribuída à remoção e degradação das barreiras constituídas pelos tecidos maternos (epitélio uterino, células decíduais, matriz extracelular e endotélio), isto é, associada à atividade invasiva das CTGs (Schlafke & Enders, 1975; Katz & Abrahamsohn, 1987; Welsh & Enders, 1991; Enders & Welsh, 1993; Ferro & Bevilacqua, 1994).

Pelos resultados aqui descritos, esta atividade fagocitária seria bastante intensa nas CTGs presentes em toda a região antimesometrial do 8º ao 11º ddg e nas bordas do CEP. O mesmo aspecto é encontrado nas CTGs das placentas em contato com o endométrio da região mesometrial até o 15º ddg, quando foram encontrados restos celulares em degeneração, em grande quantidade, interiorizados em vesículas intracitoplasmáticas das CTGs. Ao nível ultra-estrutural, estas CTGs apresentavam em seu citoplasma, lisossomas

primários e secundários contendo fragmentos celulares em diferentes graus de degeneração.

A presença de lisossomas e de fagossomas contendo restos celulares no interior das CTGs de camundongos tem sido descrita em estudos morfológicos (Katz & Abrahamsohn, 1987; Parr et al., 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988, 1989; Blankenship & Given, 1992; Ferro & Bevilacqua, 1994). A presença de lisossomas nas CTGs e a evidência de sua atividade fagocitária têm sido apontadas para correlacionar o comportamento destas células ao comportamento de macrófagos (Guilbert, 1993; Albieri & Bevilacqua, 1996). Albieri & Bevilacqua (1996) demonstraram que as CTGs "in vitro" são estimuladas na sua atividade eritrofagocitária, através da ação de acetato de forbol miristrato (PMA) e retinal, à semelhança dos macrófagos. O PMA e o retinal ativam a fagocitose de macrófagos pela geração de espécies ativas de oxigênio (EAO) e o mesmo mecanismo foi observado em CTGs por Gaglioti (1994) e Gagliotti et al. (1995).

Os resultados imunocitoquímicos para detecção das anticatpsinas D e B, demonstraram que a maioria das CTGs apresenta imunomarcações positivas no seu citoplasma, confirmando a presença destas enzimas lisossomais. Na região antimesometrial, do 8º ao 11º ddg, as imunomarcações positivas para as anticatpsinas foram verificadas nas CTGs presentes na interface com o tecido materno, e nos prolongamentos citoplasmáticos que se insinuavam entre as células decíduais. Padrão semelhante foi detectado nas CTGs do perímetro placentário do 11º ao 15º ddg. As imunomarcações encontradas nas CTGs da abóbada placentária diminuíam drasticamente, quando a placenta atingia a sua maturidade. No 18º ddg praticamente não foram detectadas reações positivas para as catepsinas nas CTGs desta região.

A positividade da imunomarcação para as catepsinas D e B nas CTGs coincide, portanto, com o período onde a atividade fagocitária destas células parece ser mais intensa, isto é, do 8º ao 13º ddg e sendo evidente sua diminuição a partir do 15º ddg.

O padrão difuso da imunomarcação obtido ao nível da microscopia fotônica não permite uma interpretação precisa na localização intracelular das enzimas lisossomais

analisadas. Fato este, que pode trazer dúvidas sobre a especificidade e precisão dos nossos resultados imunocitoquímicos ao nível da microscopia fotônica. Considerações sobre os possíveis resultados artefatuais estão descritas adiante, porém, a especificidade do anticorpo utilizado pode ser comprovada pelo “western blotting”, assim como a precisão do sítio da imunomarcacão pode ser comprovada pela imunomicroscopia eletrônica.

Na imunomicroscopia eletrônica, as partículas de ouro coloidal identificaram precisamente a localização das enzimas catepsinas D e B nos fagolisossomas e nos pequenos lisossomas primários. Comprova-se, portanto, que tais enzimas estão presentes nas CTGs e sendo encontradas compartimentalizadas nas organelas do sistema lisossoma-endosomico, devem atuar na atividade fagocitária destas células, isto é, o conteúdo dos fagossomas devem sofrer ação lítica destas enzimas lisossomais.

Por outro lado, além destas vesículas intracitoplasmáticas foi comum a presença de compartimentos delimitados pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs contendo restos celulares em diversos estágios de degeneração. Esta imagem foi encontrada nas CTGs da interface, tanto da região antimesometrial ao redor do embrião (8º ao 11º ddg) quanto naquelas do perímetro placentário (13º e 15º ddg) da região mesometrial. Contudo, nas CTGs achatadas e alongadas dos estágios mais avançados da placentação (18º ddg), não foram encontrados tais aspectos.

Na implantação embrionária de roedores, são as CTGs que, após a destituição do epitélio uterino (Weitlauf, 1988), penetram no estroma endometrial (Welsh & Enders, 1987; Enders & Welsh, 1993). Este processo é atribuído à capacidade invasiva das CTGs (Welsh & Enders, 1987; Barbiaz et al., 1992; Enders & Welsh, 1993; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1994) associada à atividade fagocitária (Enders & Welsh, 1993; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1994).

O nosso estudo não incluiu as fases iniciais da implantação embrionária, porém o processo da placentação através da proliferação de células trofoblásticas do CEP envolve a ativa participação das CTGs. As CTGs oriundas do CEP invadem o estroma uterino da região mesometrial e abrem caminho para a placentação (Coop, 1979). Os nossos

resultados mostram CTGs no período pré-placentário (8^o a 9^o ddg) e durante a organogênese da placenta (11^o a 15^o ddg), em franca atividade invasivo-fagocitária, isto é, CTGs ou seus prolongamentos infiltrando-se entre as células decidualizadas e CTGs apresentando profusão de fagossomas em seu interior.

Durante praticamente todo o período gestacional analisado, próximas às CTGs, ou muitas vezes envolvidas por seus prolongamentos citoplasmáticos, era bastante comum a presença de células deciduais ou fragmentos destas em degeneração. Assim como, também puderam ser observadas algumas células deciduais intactas fazendo justaposição com as CTGs. De acordo com Tachi et al. (1970) e Bevilacqua & Abrahamsohn (1989), as CTGs devem fagocitar e degradar as células deciduais encontradas em processo de degeneração, mas não as células deciduais sadias.

Pela microscopia fotônica, o conteúdo dos compartimentos delimitados pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs também demonstrava marcação positiva para anticatpsina D e B, nos períodos pré-placentários, sendo observada maior intensidade no 11^o ddg.

Na imunomarcação ao nível ultra-estrutural constataram-se, também, marcações positivas nos compartimentos delimitados pelas projeções citoplasmáticas das CTGs, ou seja, no meio extracelular. Estas imagens eram mais freqüentes nos materiais coletados de placentas mais jovens (até o 13^o ddg) e nos materiais coletados do período pré-placentário. Algumas destas imunomarcações foram encontradas sobre fibrilas colágenas em degeneração, o que nos leva a associar a presença da catepsina D ao processo colagenolítico. A ação da catepsina D sobre componentes da matriz extracelular tem sido descrita por vários autores (Bando et al., 1986; Kügler & Vornberger, 1986) e este processo poderia ser desempenhado também pelas CTGs, durante a sua atividade invasiva.

O comportamento invasivo das CTGs tem sido comparado ao das células tumorais malignas (Graham & Lala, 1991; Shukla et al., 1991). De acordo com Inoué et al. (1994), as células neoplásicas malignas aderem-se à membrana basal e liberam hidrolases que vão

degradar a matriz no local e acabam por permitir que as células tumorais se movimentem através da matriz modificada.

A presença de catepsina D (Johnson et al., 1993; Isola et al., 1993; Scambia et al., 1994), catepsina B (Sukoh et al., 1994 a, b; Spiess et al., 1994) e catepsina L (Castiglioni et al., 1994; Sukoh et al., 1994b) em células tumorais têm sido associada à metástase e à atividade invasiva destas células. Kandalaft et al. (1993) e Schutz et al. (1994) demonstraram que a catepsina D é secretada pelas células tumorais de mama e Johnson et al. (1993) associam os altos níveis de catepsina D nas células cancerígenas de mama a um prognóstico ruim. Segundo estes autores, a produção da catepsina D indica o aumento do potencial invasivo e metastático do tumor. Scambia et al. (1994) sugerem que este tipo de secreção também possa ocorrer nas células tumorais de ovário, influenciando no estabelecimento e na expansão do tumor.

A descrição morfológica do processo invasivo acima é bastante semelhante ao descrito para as CTGs na implantação normal (Welsh & Enders, 1987; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989), sugerindo uma possível secreção de enzimas hidrolíticas por parte das CTGs durante a sua ação invasiva. Porém, a invasão das CTGs no estroma endometrial é controlada topológica e cronologicamente, enquanto o mesmo não ocorre com as células tumorais malignas (Graham & Lala, 1991).

A secreção de enzimas proteolíticas para o meio extracelular por células trofoblásticas já foi sugerida (Glass et al., 1983; Hamilton et al., 1991; Barbiarz et al., 1992). Katz (1995) demonstrou a presença da fosfatase ácida no meio extracelular próximo às CTGs e atribuiu uma possível liberação desta enzima como sendo parte do processo de remodelação da matriz extracelular e do processo de invasão no estroma decidualizado.

No entanto, até os dias atuais, não existem trabalhos comprovando liberação de enzimas lisossomais pelas CTGs. Em nossas análises, não foram encontradas imagens que demonstrassem o momento da liberação do conteúdo lisossomal pelas CTGs para o meio extracelular. Contudo, a imunomarcação positiva para a anticathepsina D, encontrada no

compartimento extracelular, é uma evidência da liberação desta enzima lisossômica e cronologicamente coincide com o período descrito como sendo de maior atividade invasiva das CTGs. De acordo com Kanai-Azuma (1994), as CTGs cessam seu período invasivo-fagocitário no final da primeira metade do período gestacional quando iniciam sua atividade secretora. Os nossos resultados demonstram que a sua atividade invasiva apenas começa a diminuir neste período, pois foram constatados fagolisossomas positivos para as anticatapsinas D e B até o 15º ddg. Além disso, a presença de prolongamentos citoplasmáticos entre as células decíduais saudáveis e em processo de degeneração sugere que a atividade invasivo-fagocitária seria mantida até esta fase.

Uma importante questão a ser ainda estabelecida é se os grandes compartimentos delimitados pelos prolongamentos citoplasmáticos das CTGs resultariam nos fagossomas verdadeiros. Se correlacionadas a quantidade de fagossomas encontrados no interior das CTGs e a quantidade de tecidos de origem materna (da região antimesometrial e mesometrial), a ser removida pelas CTGs no curto espaço de tempo que perdura a sua atividade invasiva, deveria ser encontrada uma maior profusão de fagossomas no interior das CTGs. Não se pode descartar, portanto, a possibilidade de que a degradação de células de origem materna ocorresse nestes compartimentos (ainda extracelulares) sob a ação de enzimas lisossômicas liberadas pelas CTGs. Gaglioti et al. (1995) sugerem uma possível atividade citolítica "in vitro" exercida pelas CTGs através da liberação de EAO para o meio extracelular, quando previamente estimuladas com PMA e retinal.

A degeneração das células decíduais poderia não ser uma consequência exclusiva da ação lítica das enzimas das CTGs, uma vez que a morte celular pela apoptose tem sido descrita para as células decíduais (Parr et al., 1987; Parr & Parr, 1989; Welsh & Enders, 1991a; Enders & Welsh, 1993). Além disso, em decíduomas mesmo não ocorrendo a influência do trofoblasto, as células decíduais também degeneram espontaneamente (Andrade, 1993; Andrade et al., 1996). De acordo com Andrade (1993), este processo de degeneração de células decíduais em decíduomas ocorre de uma forma bem mais lenta que o observado na presença do embrião. Por sua vez, Gaglioti (1994) sugere que a

liberação de espécies reativas de oxigênio pelas CTGs também poderia ser responsável pela injúria tecidual e que o processo de morte pré-programada de células endometriais poderia ser acelerado e até mesmo influenciado pelas CTGs.

Para a catepsina B não foi encontrada imunomarcacão no meio extracelular sugerindo um padrão diferente ao apresentado pela catepsina D. Porém, as reações imunocitoquímicas para a catepsina D sempre foram mais intensas do que as observadas para a catepsina B, independentemente do método utilizado. Este fato pode sugerir a princípio, que a catepsina D estaria presente em maior quantidade no interior das CTGs e, portanto, a sensibilidade do método utilizado não tenha permitido identificar a catepsina B. Devemos considerar, ainda, as diferenças de suscetibilidade dos epítomos antigênicos ao processamento. Nas nossas técnicas imunoistoquímicas utilizando-se cortes de materiais fixados com glutaraldeído para microscopia fotônica, não obtivemos resultados positivos para as catepsinas, mesmo com a ação da microonda. Sannes et al. (1986) relataram uma possível inativação da catepsina B durante o procedimento da fixação.

No tocante aos resultados das reações imunoistoquímicas, cabe discutir as variações de técnicas utilizadas para otimização nas tentativas de detecção das anticatapsinas D e B. Embora não constasse dos objetivos primários deste trabalho, o estudo comparativo realizado para os métodos imunoistoquímicos, teve importância na interpretação dos resultados e permitiu estabelecer as limitações de cada uma das técnicas neste modelo experimental.

Sem dúvida, as reações de imunomarcacão, obtidas em criocortes com fixação branda, resultaram na maior sensibilidade na detecção dos antígenos estudados. Porém a interpretação dos sítios reativos, particularmente da placenta, era dificultada pela má preservação morfológica. Nas tentativas de se obter uma melhor preservação morfológica, constatou-se que a introdução do glutaraldeído inibiu a imunomarcacão de forma irreversível nos cortes de parafina. O artifício do uso da microonda, procedimento amplamente utilizado nas diversas etapas da histotécnica (Leong & Duncis, 1986; Hotta et

al., 1990; Hopwood, 1992) e na imunocitoquímica (Login, 1986; Stirling & Graff, 1995), mostrou-se eficiente em restaurar o epítipo antigênico nos materiais processados em parafina. Porém, resultou na presença de um artefato indesejável para o método da imunoperoxidase. Isto é, as hemácias (não todas) apresentaram uma reação inespecífica pela diaminobenzidina não removível pelos métodos convencionais de inibição. Fez-se necessário, portanto, a utilização de dois métodos distintos e o cruzamento destes dados para comprovar a especificidade e fidelidade dos resultados obtidos.

Tais resultados demonstram, claramente, a necessidade de padronização cuidadosa dos procedimentos para a técnica imunoistoquímica e na interpretação dos seus resultados (positivos e negativos). Os controles positivos com estes anticorpos, realizados concomitantemente em cortes de rim, demonstraram os mesmos sítios imunorreativos descritos por Yokota et al. (1985a, 1986 a e b) e Yokota & Kato (1988).

Desta forma, os nossos resultados imunocitoquímicos são inequívocos quanto à sua especificidade. As variações nas localizações das imunomarcações, principalmente nos espaços intercelulares das CTGs são evidências irrefutáveis de que estas enzimas seriam liberadas para o meio extracelular e, portanto, estariam envolvidas na atividade invasiva.

8 - CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- As características morfológicas das células trofoblásticas gigantes (CTGs) variam de acordo com a localização e o período gestacional.

- Os métodos imunoistoquímicos demonstraram a presença das catepsinas D e B nas CTGs, sendo as imunomarcações detectadas predominantemente nas células presentes no período correspondente à maior atividade invasiva e fagocitária.

- A imunomicroscopia eletrônica confirmou a presença das catepsinas D e B nos lisossomas e fagolisossomas das CTGs, demonstrando de forma inequívoca a participação destas enzimas na degradação de substratos celulares por ela fagocitados.

- A imunomicroscopia eletrônica confirmou a presença da catepsina D nos espaços extracelulares próximos às CTGs, sugerindo a ação destas enzimas lisossômicas na degradação do tecido materno.

- A presença das enzimas catepsinas D e B nos sítios placentários de camundongos e a especificidade das reações imunocitoquímicas foram confirmadas pelos resultados da reação imunoquímica (“western-blotting”).

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol.*, **166**: 263-74, 1983.
- ABRAHAMSOHN, P. A. & ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.*, **266**: 603-28, 1993.
- ALBERTO-RINCON, M. C.; ZORN, T.; ABRAHAMSOHN, P. A. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Am. J. Anat.*, **186**: 417-29, 1989.
- ALBIERI, A. & BEVILACQUA, E. Induction of erytrophagocytic activity in cultured mouse trophoblast cells by phorbol myristate acetate and all-trans-retinal. *Placenta*, **17**: 507-12, 1996.
- ANDRADE, C. G. T. J. Decidualização induzida em camundongas pseudo-grávidas. Estudo morfológico ultraestrutural. São Paulo, 1993. 92p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- ANDRADE, C. G. T. J.; ABRAHAMSOHN, P. A.; GODINHO, F.; SAMUEL, E.; ZORN, T. M. T. Death and replacement of uterine epithelial cells during oil-induced deciduoma development in the mouse. *Anat. Rec.*, **244**: 316-26, 1996.
- ARAKI, N.; YOKOTA, S.; TAKASHIMA, Y.; OGAWA, K. The distribution of cathepsin D in two types of lysosomal profiles of rat hepatocytes as revealed by combined immunocytochemistry and acid phosphatase enzyme cytochemistry. *Exp. Cell Res.* **217**: 469-76, 1995.

- AZUMA, M., KANAI, Y.; OGURA, A.; KUROHMARU, M.; HAYASHI, Y.
Effect of placental soluble factors on growth and differentiation of mouse ectoplacental cone in vitro. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**: 839-45, 1991.
- BABIARZ, B. S.; ROMAGNANO, L. C.; KURILLA G. M. Interaction of mouse ectoplacental cone trophoblast and uterine decidua in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **28A**: 500-08, 1992.
- BANDO, Y.; KOMINAMI, E.; KATUNUMA, N. Purification and tissue distribution of rat cathepsin L. *J. Biochem.*, **100**: 35-42, 1986.
- BARLOW, P. W. & SHERMAN, M. I. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**:447-65, 1972.
- BARON, R. Molecular mechanisms of bone reabsorption by the osteoclast. *Anat. Rec.*, **224**: 317-21, 1989.
- BERGQUIST, A.; FERRIO, M.; MATTSON, S. A comparison of cathepsin D levels in endometriotic tissue and in uterine endometrium. *Fertil. Steril.*, **65**, 1996.
- BEVILACQUA, E. M. A. F. & ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. *J. Morphol.*, **198**: 341-51, 1988.
- BEVILACQUA, E. M. A. F. & ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch. Biol. Med. Exp.*, **22**:107-8, 1989.

- BEVILACQUA, E. M. A. F. & ABRAHAMSOHN, P. A. Growth of mouse embryos implanted in the subcutaneous tissue of recipient mice. *J. Exp. Zool.*, **257**: 386-400, 1991.
- BEVILACQUA, E. & ABRAHAMSOHN, P. A. Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue. *Acta Anat.*, **150**: 246-52, 1994.
- BILLINGTON W. D. Biology of the trophoblast: In *Advances in Reproductive Physiology*. Bishop M.N.H. (ed) London, Logos Press, V5: p 27-66, 1971.
- BLANKENSHIP, T. N. & GIVEN, R. L. Penetration of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Record.*, **233**: 196-204, 1992.
- BULMER, D. & DICKSON, A. D. Observations on carbohydrate materials in the rat placenta. *J. Anat.*, **94**:46-58, 1960.
- BURLEIGH, M. C.; BARREIT, A. J.; LAZARUS, G. S. Cathepsin B₁ - A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *J. Biochem.*, **137**: 387-98, 1974.
- BURNETT, D.; ABRAHAMSON, M.; DEVALIA, J. L.; SAPSFORD, R. J.; DAVIES, R. J.; BUTTLE, D. J. Synthesis and secretion of pro cathepsin B and cystatin C by human branchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**: 305-10, 1995.
- CARTHER, J. The expression of surface antigens on three trophoblastic tissue in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, **54**: 433-39, 1978.

- CASTIGLIONI, T.; MERINO, M. J.; ELSNER, B.; LAH, T. T.; SLOANE, B. F.; EMMERT-BUCK, M. R. Immunohistochemical analysis of cathepsins B, D and L in human breast cancer. *Hum. Pathol.*, **25**: 857-62, 1994.
- COPP, A. J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst I. A study of cellular proliferation. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **48**: 109-25, 1978.
- COPP, A. J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst (the fate of the polar trophectoderm) *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **5**: 109-20, 1979.
- DAMSKY, C.; WHEELOCK, M. J.; TOMASELLI, K. J.; SUTHERLAND, A.; CROWLEY E.; FISHER, S. J. Cell-cell and cell-matrix adhesion receptors: Family relationships and roles in migratory and invasive systems; in *Morphoregulatory molecules*. Ed. Edelman GM, et al, New York, p 547-73, 1990.
- DeFEO, V. J. Decidualization. **In:** *Cellular Biology of the uterus*. Ed. Wynn, R. M. Appleton-Century Crofts, New York p 191-290, 1967.
- DENKER, H.W. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: A cell biological paradox. **In:** *Trophoblast invasion and endometrial receptivity. Novel aspects of the cell biology of embryo implantation*. Ed. Werner-Denker, H. & Aplin, J.D., Plenum Med. Book, New York, p 245-308, 1990.
- DICKSON, A. D. The form of the mouse blastocist, *J. Anat.*, **100**: 29-68, 1966.

- ELANGO VAN, S. & MOULTON, C. Progesterone and estrogen control of rats synthesis of uterine Cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, **255**:7474-9, 1980.
- ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemovorial placentas. *Am. J. Anat.*, **116**: 29-68, 1965.
- ENDERS, A. C. & WELSH, A, O. Structural interations of trophoblast and uterus during hemocorial placenta formation. *J. Exp. Zool.*, **266**: 578-87, 1993.
- ERICKSON, A. H. & BLOBEL G. Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, **254**: 11771-4, 1979.
- ETHERINGTON, D. J. Collagenolytic-cathepsin and acid-proteinase activities in the rat uterus during post partum involution. *Eur. J. Biochem.*, **32**: 126-28, 1973.
- FARIA, M. & BEVILACQUA, E. Cytological aspects of vascular invasion by the trophoblast of *Calomys callosus* in hepatic tissues. *J. Morphol.*, **226**:159-71, 1995.
- FAWCETT, D.W. The development of mouse ova under the capsule of the kidney. *Anat. Rec.*, **108**:71-91, 1950.
- FERRO, E. A. V. & BEVILACQUA, E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (rodentia, cricetidae). *J. Morphol.*, **221**:139-52, 1994.

- FINN, C.A. The implantation reaction. **In:** *Cellular biology of the uterus*. Ed. Wynn, R.M., North-Holland Pub. Amsterdam, pp 245-308, 1977.
- FINN, C. A. & MARTIN, L. The control of the implantation. *J. Reprod. Fert.*, **39**: 195-206, 1974.
- GAGIOTI, S. M. Liberação de espécies ativas de oxigênio pelas células trofoblásticas de camundongos. Estudo bioquímico e citoquímico ultra-estrutural., São Paulo. 1994, 116p. (Tese de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- GAGIOTI, S.; COLEPICOLO, P.; BEVILACQUA, E. Post implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**: 1111-6, 1995.
- GARDNER, R.; PAPAIOANNOU, V. E.; BARTON, S. C. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J. Embr. Exp. Morph.* **30**: 561-72, 1973.
- GIESELMANN, V.; HASILIK, A.; FIGURA, K. Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3215-20, 1985.
- GLASS, R. H.; AGGELER, J.; SPINDLE, A.; PEDERSEN, R. A.; WERB, Z. Degradation of extracellular matrix by mouse trophoblast outgrowths: A model for implantation. *J. Cell Biol.* **96**: 1108-1116, 1983.

- GOTO, T.; TSUKUBA, T.; KIYOSHIMA, Y.; KATO, K.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, T. Immunohistochemical localization of cathepsins D, B and L in the rat osteoclast. *Histochem.*, **99**: 411-14, 1993.
- GOTO, T.; KIYOSHIMA, T.; MAROJ, R.; TSUKUBA, T.; NISHIMURA, Y.; HIMENO, M.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, T. Localization of cathepsin B, D and L in the rat osteoclast by immuno-light and electron microscopy. *Histochem.*, **101**:33-40, 1994.
- GRAHAM, C. H. & LALA, P.K. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell. Physiol.*, **148**: 228-34, 1991.
- GRAHAM, C. H. & LALA, P.K. Mechanism of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem. Cell. Biol.*, **70**: 867-74, 1992.
- GRAHAM, C. H.; LYSIAK, J. J.; McCRAK K. R.; LALA, P.K. Localization of transforming growth factor β at the human fetal-maternal interface: role on trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.*, **46**: 561-72, 1992.
- GROH, V. & MAYERSBACH, H. Enzymatic and functional heterogeneity of lysosomes. *Cell. Tissue Res.*, **214**: 613-21, 1981.
- GUILBERT, L.; ROBERTSON, S. A.; WEGMANN, T. G. The trophoblast as an integral component of macrophage-cytokine network. *Immunol. Cell Biol.*, **71**: 49-57, 1993.
- HAIMOVICI, F. & ANDERSON, D. J. Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast in vitro. *Biol. Reprod.*, **49**: 124-30, 1993.

- HAMILTON, R. T.; BRUNS, K. A.; DELGADO, M. A.; SHIM, J.; FANG, Y.; DENHARDT, T.; NILSEN-HAMILTON, M. Developmental expression of cathepsin L and c-ras^{Ha} in the mouse placenta. *Molec. Reprod. Develop.*, **30**: 285-92, 1991.
- HASILIK, A. & NEUFELD, E. F. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **255**: 4937-45, 1980.
- HIGASHIYAMA, M.; DOI, O.; KODOMA, K.; YOKOUCHI, H.; TATEISHI, R. Cathepsin B expression in tumor cells and laminin distribution in pulmonary adenocarcinoma. *J. Clin. Pathol.* **46**: 18-22, 1993.
- HOFFMAN, L. H. & WOODING, F. B. P. Giant and binucleate cells of mammals. *J. Exp. Zool.*, **266**: 559-77, 1993.
- HOFMANN, G. E.; HOROWITZ, G. M.; SCOTT, R. T.; NAVOT, D. Transforming growth factor α in human implantation trophoblast: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J. Clin. End. Metab.*, **76**: 781-85, 1993.
- HOPWOOD D. Microwaves in tissue preparation. *Proceedings RMS*, **27**: 71-4, 1992.
- HOROWITZ, G. M.; SCOTT, R. T.; DREWS, M. R.; NAVOT, D.; HOFFMANN, G. E. Immunohistochemical localization of transforming growth factor α in human endometrium decidua and trophoblast. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **76**: 786-92, 1993.

- HOTTA, Y.; KATO, H. & WATARI, N. A simple and rapid maceration method for electron microscopy using microwave. *J. Electron Microsc.* **39**: 63-6, 1990.
- IGDOURA, S. A.; MORALES, C. R.; HERMO, L. Differential expression of cathepsins B and D in testis and epididymis of adult rats. *J. Hist. Cytochem.*, **43**: 545-57, 1995.
- II, K.; HIZAWA, K.; KOMINAMI, E.; BANDO, Y.; KATUNUMA, N. Different immunolocalization of cathepsins B, H, and L, in the liver. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**: 1173-5, 1985.
- ILGREN, E. B. On the control of the trophoblastic giant cell transformation in the mouse: homotypic cellular interaction and polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **62**: 183-202, 1981.
- ILGREN, E. B. Control of trophoblastic growth. *Placenta* **4**: 307-28, 1983.
- INOUE, T.; ISHIDA, T.; SUGIO, K.; SUGIMACHI, K. Cathepsin B expression and laminin degradation as factor influencing prognosis of surgically treated patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Research.*, **54**: 6133-6, 1994.
- IRVING, J. A. & LALA, P. K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: Regulation by TGF β , TGF II and IGFBP I. *Exp. Cell. Res.*, **217**: 419-27, 1995.
- ISOLA, J.; WEITZ, S.; VISAKORPI, T.; HOLLI, K.; SHEA, R.; KHABBAZ, N.; KALLIONIEMI, O. Cathepsin D expression detected by

immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **11**: 36-43, 1993.

IWAKURA, Y. Mechanism of the blastocyst formation of the mouse embryo. *Dev. Growth & Differ.*, **31**: 523-29, 1989.

JOHNSON, M. D.; TORRI, J. A.; LIPPMAN, M. E.; DICKSON, R. B. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **53**: 873-77, 1993.

JOLLIE, W. P. Age changes in the fine structure of rat trophoblast giant cells. *Anat. Embryol.*, **162**: 105-19, 1981.

JOLLIE, W. P. & CRAIG, S. S. The fine structure of placentae junctional zone cells during prolonged pregnancy in rats. *Acta Anat.*, **105**: 386-400, 1979.

KAGEYAMA, T.; YONEZAWA S.; ICHINOSE, M.; MIKE, K.; MORIYAMA, A. Potential sites for processing of the human invariant chain by cathepsins D e E *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **223**: 549-53, 1996.

KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y.; KUROHMARU, M.; SAKAI, S.; HAYASHI, Y. Insulin-like growth factor (IGF-I) stimulates proliferation and migration of mouse ectoplacental cone cells, while IGF-II transforms them into trophoblastic giant cells in vitro. *Biol. Reprod.*, **48**: 252-61, 1993.

KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y.; KUROHMARU, M.; TACHI, C.; YAZAKI, K.; HAYASHI, Y. Giant cell transformation of trophoblast cells in mice. *Endocrine J.*, **41** (suppl): 33-41, 1994.

- KANDALAFT, P. L.; CHANG, K. L.; AHN, C. W.; TRAWEEK, S. T.; MEHTA, P.; BATTIFORA, H. Prognostic significance of immnohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer. *Cancer*, 71: 2756-63, 1993.
- KATZ, S. & ABRAHAMSOHN, P. A. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse (an ultrastructural study). *Anat. Embryol.*, 176: 251-8, 1987.
- KATZ, S. Extracellular and intracellular degradation of collagen by trophoblast giant cells in acute fasted mice examined by electron microscopy. *Tissue & Cell*, 27: 713-21, 1995.
- KAWABATA T.; NISHIMURA, Y.; HIGAKI, M.; KATO, K. Purification and processing of rat liver pro-cathepsin B. *J. Biochem.*, 113:389-94, 1993.
- KIRBY, D.R.S. Development of the mouse blastocyst transplanted to the spleen. *J. Reprod. Fertil.*, 5: 1-12, 1963.
- KIRBY, D. R. S. & BRADBURY, S. The hemo-chorial mouse placenta. *Anat. Rec.*, 152: 279-82, 1965.
- KIYOSHIMA, T.; TSUKUBA, T.; KIDO, M. A.; TASHIRO, H.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, T. Immunohistochemical localization of cathepsins B and D in the synovial lining cells of the normal rat temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.*, 38: 357-9, 1993.

- KOMINAMI, F.; TSUKAHARA, T.; BANDO, Y.; KATUNUMA, N. Distribution of cathepsins B and H in the tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem.*, **8**: 87-93, 1985.
- KOMINAMI, F.; UENO, T.; MUNO, D.; KATUNUMA, N. The selective role of cathepsins B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS* **287**: 182-92, 1991.
- KUGLER, P. & VORNBERGER, G. Renal cathepsin-B activities in rats after castration and treatment with sex hormones. *Histochem.* **85**: 157-161, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Paris)*, **227**: 680-85, 1970.
- LALA, P.K. & GRAHAM, C. H. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and proteases inhibitors. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**: 369-79, 1990.
- LARSEN, L. B.; BOISEN, A.; PETERSEN, T. E. Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH. *Febbs Let.*, **319**: 54-8, 1993.
- LEA, R. G. & CLARCK, D. A. Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. *Bailliere's Clin. Obstet. Gynecol.*, **5**: 25-59, 1991.
- LEONG, A. S-Y.; & DUNCIS, C. G. A method of rapid fixation of large biopsy specimens using microwave irradiation. *Phathol.* **18**: 222-5, 1986.

- LIOTTA, L. A. ; RAO, C. N.; WEWER, U. M. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**: 1037-57, 1986.
- LOGIN, G.; STAVIENOHA, W. B.; DOVIRAK, A. M. Ultrafast microwave energy for electron microscopy. *J. Histochem. Citochem.* **34**: 381-7, 1986.
- LYSIAK, J. J.; HAN, V. K. M.; LALA, P. K. Localization of transforming growth factor α in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth. *Biol. Reprod.*, **49**: 885-95, 1993.
- MATSUISHI, M.; MATSUMOTO, T.; OKITANI, A.; KATO H. Mode of action of rabbit skeletal muscle cathepsin B towards myofibrillar proteins and the myofibrillar structure. *Int. J. Biochem.*, **24**: 1967-78, 1992.
- MEHROTRA, P. K. Ultrastructure of mouse ectoplacental cone cells. *Biol. Struct. Morphog.*, **1**: 63-8, 1988.
- MÉTAYÉ, T.; MILLET, C.; KRAIMPS, J. L.; AUBOUIN, B.; BARBIER, J.; BÉGON, F. Estrogen receptors and cathepsin D in human tireoid tissue. *Cancer*, **72**:1991-6, 1993.
- MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contrib. Embriol. Carneg. Instn.* **26**: 129-246, 1937.
- MULLINS, D. E. & ROHRLICH, S. T. The role of proteinases in cellular invasiveness. *Biochem. Biophys. Acta*, **695**: 177-214, 1982.

- MÜNTENER M. & HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta in the mouse. *Acta Anat.*, **98**: 241-252, 1977.
- NAKANISHI, H.; TOMINAGA, K.; AMANO, T.; HIROTSU, I.; INOUE, T.; YAMAMOTO, K. Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B and L in the rats tissues. *Exp. Neurol.*, **126**: 119-28, 1994.
- NIEDER, G. L. & JENNES, L. Production of mouse lactogen-I by trophoblastic giant cells in utero and "in vitro" *Endocrinology*, **126**: 2809-14, 1990.
- O'GRADY, J. E. & BELL, S. C. The role of the endometrium in blastocyst implantation. In: *Development in Mammals*, Martin Ed. Elsevier-North Holland Inc. New York, p 165-243, 1977.
- PARR, E. L.; TUNG, H. N.; PARR, M. B. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.*, **36**: 211-25, 1987.
- PARR, M. B. & PARR, E. L. The Implantation Reaction. In: *Biology of the Uterus*. R. M. Wynn & W. P. Jollie eds. Plenum Publishing Corporation. New York, pp 233-77, 1989.
- PEEL, S. & BULMER, D. Proliferation and differentiation of the trophoblast in the establishment of the rat chorio-allantoic placenta. *J. Anat.*, **124**: 675-87, 1976.

- PETANCESKA, S.; BURKE, S.; WATSON, J.S.; DEVI, L. Differential distribution of messenger RNAs for cathepsins B, L and S in adult rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* **59**: 729-38, 1994.
- POTTS, D. M. The ultrastructure of the implantation in the mouse. *J. Anat.*, **103**: 77-90, 1968.
- PUNNONEN, E.; AUTIO, S.; MARJOMÄKI, V. S.; REUNANEN, H. Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in culture rat fibroblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, **40**: 1579-87, 1992.
- ROBY, K. F. & SOARES, J. M. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta*, **14**: 529-45, 1993.
- ROGERS, P. A. W. & MURPHY, C. R. Uterine receptivity for implantation. In: *Blastocyst Implantation*. Ed. K. Yoshinaga, Boston, Adans Publ., p. 231-38, 1989.
- ROSSANT, J. & CROY, B. A. Genetic identification of tissue origin of cellular populations within the mouse placenta. *J. Embryo Exp. Morph.*, **86**: 177-89, 1985.
- ROSENFELD, M. G.; KREIBICH, K.; POPOV, D.; KATO, K.; SABATINI, D. D. Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post- translational processing in determining their subcellular distribution. *J. Cel. Biol.*, **93**: 135-43, 1982.
- ROZHIN, J.; SAMENI, M.; ZIEGLER, G.; SLOANE, B. F. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.*, **54**: 6517-25, 1994.

- SANNES, P. L.; SCHOFIELD, B. H.; McDONALD, D. F. Histochemical localization of cathepsin B, dipeptidyl peptidase and dipeptidyl peptidase II in rat bone. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 983-8, 1986.
- SANO, K.; WAGURI, S.; SATO, N.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Y. Coexistence of renin and cathepsin B in secretory granules of granular duct cells in male mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**: 433-8, 1993.
- SCAMBIA, G.; PANICI, P. B.; FERRADINA, G.; SALERNO, G.; D'AUGOSTINO, G.; DISTEFANO, M.; De VICENSO, R.; ERCOLI, A.; MANCUSO, S. Clinical significance of cathepsin D in primary ovarian cancer. *Eur. J. Cancer*, **30A**: 935-40, 1994.
- SCHLAFKE, S. & ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.*, **12**: 41-65, 1975.
- SCHULTZ, D. C.; BAZEL S.; WRIGHT, L. M.; TUCKER S.; LANGE, M. K.; TACHOVSKY, T.; LONGO, S.; NIEDEBALA, S.; ALHADEFF, J. A. Western blotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in breast tissue and sera patients with breast cancer and benign breast disease and of normal controls. *Cancer Res.*, **54**: 48-54, 1994.
- SHUKLA, R.; MEHROTRA, P. K.; MAITRA, S. C.; KAMBOJ, V. P. Ultrastructural morphology of ectoplacental cone trophoblasts of hamster embryos. *Acta Anat.*, **142**: 105-10, 1991.

- SHERMAN, M. I. Endocrinology of rodent trophoblast cells. **In:** *Biology of the trophoblast*. Y. W. Loke and A. Whyte, eds. Elsevier, Amsterdam, pp 401-67, 1983.
- SIMMONS, R. L. & RUSSEL, P. S. The antigenicity of mouse trophoblast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **99**: 717-32, 1962.
- SMITH, F. A. & WILSON, I. B. Cell interaction at the maternal-embryonic interface during implantation in the mouse. *Cell Tiss. Res.* **152**: 525-42, 1974.
- SOARES, M. J. & GLASSER, S. R. Placental lactogen production and functional differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **79**: 335-341, 1987.
- SOARES, M. J.; FARIA, T. N.; HAMILIN, G. P.; LU, X. J.; DEB, S. Trophoblast cell differentiation: expression of the placental prolactin family. **In:** *Trophoblast cells: Pathways for maternal-embryonic communications*, Ed. Soares, M. J.; Handwerger, S.; Talamares, F., New York, pp. 45-67, 1993.
- SOARES, M. J.; JULIAN, A. J. ; GLASSER, S. R. Trophoblast giant cell release of placental lactogens: Temporal and regional characteristics. *Dev. Biol.*, **107**: 520-26, 1985.
- SOARES, M. J.; CHAPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C. A.; TAMEI, T.; ORWING, K. E. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta*, **17**: 277-89, 1996.

- SPIESS, E.; BRÜNING, A.; GACK, S.; ULBRICHT, B.; SPRING, H.; TREFFZ, G.; EBERT, W. Cathepsin B activities in human lung tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity and inhibitor status at the cell level. *J. Histochem. Cytochem.*, **42**: 917-29, 1994.
- STIRLING, J. W. & GRAFF, P. S. Antigen unmasking for immunoelectron microscopy: Labeling is improved by treating with sodium ethoxide or sodium metaperiodate, then heating on retrieval medium. *J. Histochem. Cytochem.* **43**: 115-23, 1995.
- STRICKLAND, S.; REICH, E.; SHERMAN, M. I. Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* **15**: 393-403, 1976.
- SUKOH, N.; ABE, S.; NAKAGIMA, I.; OGURA, S.; ISOBE, H.; INOUE, K.; KAWAKAMI, Y. Immunohistochemical distributions of cathepsin B and basement membrane antigens in human lung adenocarcinoma association with invasion and metastasis. *Virchows Archiv.*, **424**: 33-8, 1994a.
- SUKOH, N.; ABE, S.; OGURA, S.; ISOBE, H.; TAKEKAWA, H.; INOUE, K.; KAWAKAMI, Y. Immunohistochemical study of cathepsin B (Prognostic significance in human lung cancer). *Cancer*, **74**: 46-51, 1994b.
- SUZUKI, H.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T. Enzymatic characterization of cathepsin D in rabbit brains with experimental neurofibrillary changes. *Biochem. and Molec. Biol. Internat.*, **32**:1033-9, 1994.
- TACHI, S.; TACHI, C.; LINDNER, H. R. Ultrastructural features of blastocysts attachment and trophoblastic invasion in the rat. *J. Reprod. Fertil.* **21**: 37-56, 1970.

- TÊTU, B.; GE, B.; RISSON, N.; CÔTÉ J.; BRISSON, C.; POTVIN, S.; ROBER, D. Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int. J. Cancer*, **55**: 429-35, 1993.
- UCHIYAMA, Y.; NAKAJIMA, M.; MUMO, D.; WATANABE, T.; WAGURI, S.; YAMAMOTO, M.; HASHIZUME, Y.; KOMINAMI, E. Immunohistochemical localization of cathepsin B in rat anterior pituitary endocrine cells, with special reference to its co-localization of renin and prorenin in gonadotrophs. *J. Histochem. Cytochem.*, **39**: 1199-205, 1991.
- UCHIYAMA, Y.; WAGURI, S.; SATO, N.; WATANABE, T.; ISHIDO, K.; KOMINAMI, E. Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases cathepsins B, H and L and their biological roles. *Acta Histochem.*, **27**: 287-308, 1994.
- VARNUZA, S.; PRIDEAUX, V.; KOTHARY R.; ROSSANT J. Polytene chromosomes in mouse trophoblast giant cells. *Development*, **102**: 127-34, 1988.
- WAGURI, S.; WATANABE, T.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Y. Variations in immunoreactivity of angiotensinogen and cathepsin B and H in rat hepatocytes over 24 hours. *Am. J. Anat.*, **187**: 175-82, 1990.
- WEITLAUF, H. M. Biology of implantation in: *Physiology of Reproduction* Ed. Knobil E. JD Neill. New York. Raven Press, 1: p 231-62, 1988.
- WELSH, A. O. & ENDERS, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the

- antimesometrial decidua and its degeneration. *Am. J. Anat.*, **172**: 1-30, 1985.
- WELSH, A. O. & ENDERS, A. C. Trophoblast-decidual cell interaction and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.*, **217**: 203-19, 1987.
- WELSH, A. O. & ENDERS, A. C. Chorioallantoic placenta formation in the rat: II Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am. J. Anat.*, **192**: 347-65, 1991a.
- WELSH, A. O. & ENDERS, A. C. Chorioallantoic placenta formation in the rat: II Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am. J. Anat.*, **192**: 347-65, 1991b.
- WOESSNER, J. F. & BREWER, T. H. Formation and breakdown of collagen and elastin in the human uterus during pregnancy and post-partum involution. *Biochem. J.*, **89**: 75-83, 1963.
- YAMADA, A.T. Comportamento de trofoblasto de camundongos em ambiente extra-uterino. São Paulo, 1990. 115p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- YAMADA, A.T. Timely and topologically defined protein synthesis in the peri-implanting mouse endometrium revealed by light and electron microscopic radioautography. *Cell. Mol. Biol.* **39**: 1-12, 1993.

- YAMADA A.T. & NAGATA, A.T. Light and electron microscopic radioautographic studies on the RNA synthesis of peri-implanting mouse uterus during activation of receptivity for blastocyst implantation. *Cell. Mol. Biol.* **39**: 221-34, 1993.
- YOKOTA, S. & ATSUMI, S. Immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in lysosomes of rat nerve cells. *Histochem.* **79**: 345-52, 1983.
- YOKOTA, S. & KATO, K. The heterogeneity of rat kidney lysosomes revealed by immunoelectron microscopic staining for cathepsins B and H. *Histochem.*, **89**: 499-504, 1988.
- YOKOTA, S.; TSUJI, H.; KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin D in lysosomes of cortical collecting tubule cells of the rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, **33** : 191-200, 1985a.
- YOKOTA, S.; TSUJI, H.; KATO, K. Localization of cathepsin D in rat liver. Immunocytochemical study using post-embedding immunoenzyme and protein A-gold techniques. *Histochem.*, **82**: 141-8, 1985b.
- YOKOTA, S.; TSUJI, H.; KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat kidney. I - Light microscopic study using the indirect immunoenzyme technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 891-7, 1986a.
- YOKOTA, S.; TSUJI, H.; KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin B in rat kidney. II - Light microscopic study using the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 899-907, 1986b.

YOKOTA, S.; TSUJI, H.; KATO, K. Immunocytochemical localization of cathepsin H in rat kidney. Light and electron microscopic study. *Histochem.*, **85**: 223-30, 1986c.

YOSHINAGA, K. Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **541**:424-38, 1988.

ZUCKERMANN, F. A. & HEAD, J. R. Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. *Placenta*, **7**: 349-64, 1986.

ABSTRACT

The trophoblastic giant cells (TGC) differentiate from trophoctoderm sheets or from the ectoplacental cone of mouse embryos and are committed to blastocyst implantation and placentation. It has attributed a high invasive capability and phagocytosis to the TGC which degenerate and remove the maternal tissues. However, the exact mechanism controlling their invasive behavior remains to be solved. Recently it has been proposed that the secretion of proteolytic enzymes to the extra cellular space by tumour cells could be a mechanism of metastasis. This mechanism could be related to TGC invasive activity.

In the aim to investigate the participation of lysosomal proteolytic enzymes in such a mechanism of TGC, the presence of cathepsin D and B by immunochemical and immunocytochemical approaches as analyzed. Mice uterine implantation sites and placentas from 8th to 18th days of pregnancy (dop) were processed for cryosections, paraffin embedding, epoxy resin and LR-white resin embedding. Pregnant uterine horn homogenates of same dop were prepared for SDS-PAGE and western-blotting. It was used rabbit polyclonal antibody anti-cathepsin D and anti-cathepsin B. In Immunohistochemical, the anti-cathepsins immunoreactive sites were analyzed by immunoperoxidase/DAB and immunofluorescence methods. The protein A-gold method was used for immunoelectronmicroscopy.

The TGCs were found surrounding the whole embryo and placenta making maternal-foetal interface at all developmental stages. At the light microscopy level, the immunoreactions were seen in the cytoplasm of TGC and inside compartments surrounded by cytoplasm processes. Positive reaction was seen near the interface between TGC and maternal tissues. At the ultrastructural level, the gold particles were seen to label the small primary and large secondary lysosomes present in the cytoplasm of TGC. The immunolabelings were also seen on the extracellular compartment around

the TGC and in the compartments surrounded by cytoplasm processes. In these compartments, cell debris resembling degenerative endometrial cells as well as extracellular matrix elements such as collagen fibrils were found. SDS-PAGE and western-blotting showed a 45 kD and 24 kD bands for cathepsin D and B respectively in the uterine homogenates.

These findings confirm the presence of cathepsin D and B in the lysosome-endosome system of TGC. Furthermore, the immunoelectronmicroscopy strongly suggests that cathepsin D is secreted to the extracellular compartment. This is probably related to the mechanism of invasivity where the proteolytic enzymes are released in to the surrounding tissues facilitating progression of the TGC invasion.