

GEORGINA LOPES CORREIA DA SILVA

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UMA α_2 - MACROGLOBULINA
SINTETIZADA PELO TECIDO DECIDUAL DO RATO**

UNIVERSIDADE DO PORTO
1998

GEORGINA LOPES CORREIA DA SILVA

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UMA α_2 -MACROGLOBULINA
SINTETIZADA PELO TECIDO DECIDUAL DO RATO**

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/07/24
Reg. 1485
Cota

FFD
SIL

UNIVERSIDADE DO PORTO
1998

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA
APRESENTADA À FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

Orientadora: Professora Doutora Natércia A. Almeida Teixeira

Aos meus Pais

Ao Manuel Serôdio

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Francisco Carvalho Guerra agradeço todo o apoio e a oportunidade de ligação ao Laboratório de Bioquímica como Bolseira de Doutoramento da JNICT. Agradeço-lhe o facto de ter sido o meu primeiro professor de Bioquímica e a forma como me revelou esta área da Ciência. Lembro-me daquelas vias metabólicas que se entrecruzavam e originavam outras...e de como me fascinaram!... Precisava de saber mais, de penetrar nesse mundo e assim se iniciou a minha paixão...

À Professora Doutora Natércia Teixeira agradeço a disponibilidade e a orientação dos trabalhos que conduziram à presente dissertação. A minha gratidão por me ter proporcionado a oportunidade de conhecer outros laboratórios e outras realidades. Não posso esquecer o modo como me iniciou e me entusiasmou na actividade de investigação e o rigor e ensinamentos que me soube transmitir.

Ao Professor Doutor Cláudio Sunkel do Laboratório de Genética Molecular do Centro de Citologia Experimental pela disponibilidade e orientação dos trabalhos na área da Biologia Molecular.

Ao Dr. Stephen Charles Bell do Departamento de Obstetria e Ginecologia da Universidade de Leicester quero agradecer o modo como me recebeu no seu laboratório, a sua amizade e as infundáveis discussões científicas que foram um estímulo para a continuação do meu trabalho. Aos colaboradores desse departamento. À Jill, Juliet, Susan, George, Sailaja e Gary. A todos agradeço a amizade, que faz com que recorde a minha estadia em Leicester com saudade e carinho.

Ao Dr. Howard Pringle do Dep. de Patologia dessa Universidade pela oportunidade da aprendizagem da técnica de hibridização *in situ* em cortes histológicos.

Ao Professor Doutor Fernando Sena Esteves pelo apoio com que sempre me distinguiu.

À Professora Doutora Elsa Bronze da Rocha pela disponibilidade e ajuda e pelo cuidado e espírito crítico com que reviu este trabalho.

Às Professoras Doutoradas Elizabeth Castro, Alice Santos Silva e Irene Rebelo pela palavra amiga, pelo estímulo e pelo apoio nas horas difíceis.

À Professora Doutora Isaura Pinto de Sousa pelo encorajamento e apoio.

Ao Professor Doutor Daniel Serrão do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto a amabilidade e a forma como disponibilizou os meios técnicos do seu laboratório. Aos técnicos desse laboratório D^a. Adelaide Machado, Sr. António Ferreira e Sr. Abílio Ferreira pela ajuda técnica e simpatia demonstradas.

Aos meus colegas Bolseiros, do Centro de Citologia Experimental. À Cristina Machado, João Almeida Santos, Paula Sampaio, Álvaro Tavares e Jorge Pedrosa pelo apoio e por bons momentos de convívio. Um agradecimento muito especial à Paula Coelho pela sua amizade e ajuda sempre presentes.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica o meu agradecimento por todo o tipo de ajuda. Não quero deixar de lembrar o Dr. Gomes Carneiro, o seu modo de estar no laboratório e como sempre inventava tempo para uma conversa ou explicação.

Quero ainda agradecer aos funcionários do Laboratório de Bioquímica. À D^a. Amélia Sousa pela sua amizade e colaboração técnica e à D^a. Emília Madureira por todo o apoio a nível de material e animais.

À D^a. Olímpia Pereira e à D^a. Céu Pereira a sua ajuda no Biotério.

Quero recordar a disponibilidade sempre manifestada pelo Eng. Rui Pinto e a execução de parte do trabalho fotográfico desta dissertação. À D. Andréa Costa do Serviço de Iconografia do Centro de Citologia Experimental agradeço a amabilidade e a execução de alguns dos trabalhos fotográficos.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica o apoio financeiro e a concessão da minha bolsa que permitiu a concretização do sonho que era trabalhar em Investigação.

Aos meus pais, a quem tudo devo, pelo seu amor e pelos valores que me transmitiram. Aos meus amigos e familiares, por me apoiarem nos momentos difíceis.

Ao meu marido, Manuel Serôdio, por todo o amor, companheirismo e incentivo.

DECLARAÇÃO

Ao abrigo do número 2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, de 18 de Agosto, declara-se que a presente dissertação inclui resultados que foram usados nas publicações abaixo indicadas. A autora colaborou na elaboração dos projectos de trabalho, na sua execução laboratorial, na interpretação dos resultados e na redacção das publicações, sob o nome de **Correia da Silva, G.**

Correia da Silva G, Teixeira N, Pringle H and SC Bell (1998). Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II by uterine tissues and the placenta during pregnancy in the rat (submetido para publicação na revista *Molecular Reproduction and Development*).

Correia da Silva G, Teixeira N and SC Bell (1996). Major secretory product of the mesometrial decidua in the rat, a variant of alpha-2-macroglobulin, binds insulin-like growth factor I via a protease-dependent mechanism. *Molecular Reproduction and Development* **44**, 103-110.

Correia da Silva G, Teixeira N, Pringle H and SC Bell (1996). Expression of mRNA encoding decidualization-associated protein, a variant of acute phase α 2macroglobulin, by rat uterine tissues during pregnancy and pseudopregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* **108**, 289-298.

Correia da Silva G, Teixeira N, Pringle H and SC Bell (1995). Expression of insulin-like growth factors I and II (IGF-I, IGF-II) mRNAs by rat non-pregnant and pregnant uterine tissues. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series*. **16**, 15.

Correia da Silva G, Pringle H, Sadek S, Teixeira N, and SC Bell (1994). Expression of decidualization associated protein mRNA by rat uterine tissues in pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **13**, 45.

Correia da Silva G, Teixeira N, O'Grady JE, Sadek S and SC Bell (1993). Decidualization associated protein, a decidual tissue-derived variant of alpha-2-macroglobulin in the rat, binds IGF-I via a protease-dependent mechanism. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **12**, 47.

Correia da Silva G, Teixeira N and SC Bell (1993). Decidualization associated protein, a decidual tissue variant of α 2macroglobulin in the rat, binds IL-6. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **11**, 94.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMO	5
INTRODUÇÃO	12
1. Características morfológicas do útero no Rato	13
2. Preparação do útero para a implantação	14
3. Implantação	15
4. Decidualização	21
5. Aspectos morfológicos da decidua e placenta	23
6. Citoquinas e factores de crescimento na decidualização	29
6.1. A interleuquina-6	32
6.2. Os factores de crescimento tipo insulina	34
7. Síntese de proteínas no início da gravidez no Homem e no Rato	39
7.1. Homem	39
7.1.1. Proteína placentária-14 (PP14)	40
7.1.2. Proteína placentária-12 (PP12), IGFBP-1	41
7.2. Rato	44
8. A proteína associada à decidualização- DAP	46
9. A α 2-macroglobulina do rato como proteína de fase aguda (AMF)	49
9.1. Activadores da síntese de AMF	51
9.2. Caracterização e propriedades fisico-químicas da AMF	52
9.3. Mecanismo de acção e função da AMF	54
10. A família das α -macroglobulinas	55
10.1. A "bait region"	59
10.2. A ligação tioéster	60
10.3. O local de ligação aos receptores	61
10.4. A função das α -macroglobulinas	62

OBJECTIVOS	68
MATERIAIS E MÉTODOS	71
1. Materiais biológicos	72
2. Sequenciação das zonas correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF	73
2.1. Extracção de RNA total e isolamento de RNA poli(A) ⁺	74
2.2. Síntese de cDNA de cadeia simples	76
2.3. "Polimerase Chain Reaction"	76
2.4. Isolamento de DNA de plasmídeo	78
2.5. Preparação de células competentes	78
2.6. Clonagem dos produtos de PCR	79
2.6.1. Ligação de fragmentos de DNA	79
2.6.2. Transformação de células competentes	80
2.6.3. Isolamento e crescimento de recombinantes	80
2.7. Marcação de sondas com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP	81
2.8. Electroforese do DNA para "Southern Blot"	82
2.9. Digestão do DNA	83
2.10. Sequenciação dos produtos de PCR	83
3. Electroforese de RNA para "Northern Blot"	84
4. Purificação da DAP e AMF	86
4.1. Preparação de extractos de tecido decidual	86
4.2. Preparação do soro de fase aguda	86
4.3. Cromatografia de troca iónica e filtração por gel	86
5. Remoção do ácido siálico	88
6. Focagem isoelectrica	88
7. Ensaio com ligandos marcados radioactivamente	88
7.1. Incubação dos factores com os extractos e proteínas purificadas	89
7.1.1. Pré-incubação com tripsina	89
7.1.2. Co-incubação com tripsina	89
7.2. Deslocamento da reacção	90
7.3. Avaliação da ligação covalente	90
7.4. Sistema de electroforese e autoradiografia	91
8. "Western blot"	91
9. Hibridização <i>in situ</i>	92
9.1. Preparação de cortes histológicos em parafina	92
9.2. Sondas de oligonucleótidos	93

9.3. Marcação das sondas com digoxigenina	94
9.4. Eficiência de marcação	94
9.5. Reacção de hibridização	95
RESULTADOS	97
1. Comparação das sequências de DNA correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF	98
2. Comparação qualitativa do conteúdo em ácido siálico da DAP e AMF	102
3. Ensaio com ligandos marcados radioativamente	103
4. Aspectos histológicos das transformações uterinas durante a gravidez e localização do mRNA codificante para o $\alpha 2M$	114
5. Localização dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II	138
DISCUSSÃO	158
1. Estudos estruturais	159
2. Ligação de citoquinas às proteínas	162
3. Localização espacial e temporal do mRNA codificante para o $\alpha 2M$ no útero	166
4. Localização espacial e temporal dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II no útero	170
5. Discussão geral	176
BIBLIOGRAFIA	180
APÊNDICE	199

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

α 1I3	"alpha1-inhibitor III"
α M	alfamacroglobulina
AMF	alfamacrofetoproteina
α -PEG	"pregnancy endometrial glycoprotein"
AUP	"alpha-uterine-protein"
bFGF	"basic fibroblast growth factor"
bp	par de bases
BSA	albumina bovina sérica
ConA	concanavalina A
CSF	"colony stimulating factor"
DAP	"decidualization-associated protein"
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
ddCTP	2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	2'-desoxinucleósido 5'-trifosfato
ddNTP	2',3'-didesoxinucleósido 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
ddGTP	2',3'-didesoxitimidina 5'-trifosfato
EGF	"epidermal growth factor"
EP	"endometrial protein"
FGF	"fibroblast growth factor"
GM-CSF	"granulocyte macrophage colony stimulating factor"

IGF	"insulin-like growth factor"
IGFBP	"insulin-like growth factor binding protein"
IL	interleuquina
IP	"induced protein"
INF	interferon
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
λ HindIII	fago lambda digerido com a enzima de restrição <i>HindIII</i>
λ PvuII	fago lambda digerido com a enzima de restrição <i>PvuII</i>
LB	meio de Luria-Bertani
LIF	"leukemia inhibitor factor"
LPS	lipopolissacarídeo
MUG	murinoglobulina
NGF	"nerve growth factor"
ON	durante a noite ("overnight")
PAF	"platellet activating factor"
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão de fosfatos ("phosphate buffer saline")
PCR	"polimerase chain reaction"
PDGF	"platellet derived growth factor"
PEP	"progestogen-dependent endometrial protein"
PHA	fitohemaglutinina A
PMSF	fenilmetil-sulfonilfluor
PP	"placental protein"
PZP	"pregnancy zone protein"
RNAase A	ribonuclease A
RPMI	meio de cultura celular
SET	solução contendo NaCl, Tris e EDTA

SSC	solução contendo NaCl e citrato de sódio
TAE	tampão de electroforese contendo Tris-acetato-EDTA
TBE	tampão de electroforese contendo Tris-borato-EDTA
TBS	tampão contendo Tris-NaCl
TdT	desoxinucleotidil terminal transferase
TE	tampão contendo Tris-EDTA
TGF	"transforming growth factor"
TIMP	"tissue inhibitor of metaloproteinases"
TNE	tampão contendo Tris-NaCl-EDTA
TNF	"tumor necrosis factor"
VEGF	"vascular endothelium growth factor"
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranosídeo

RESUMO

RESUMO

A proteína associada à decidualização (DAP) é o principal produto de secreção do tecido decidual durante a gestação no rato. É uma α 2-macroglobulina (α 2M) com propriedades físico-químicas semelhantes à alfa-macroglobulina (AMF), proteína de fase-aguda que sofre um aumento de concentração no plasma em casos de inflamação e dano tecidual. Esta glicoproteína no rato apresenta assim, duas origens tecidulares, uma hepática e uma decidual, não se sabendo se são produtos de genes muito semelhantes ou se são proteínas que sofreram modificações pós-tradução. Enquanto que a função da AMF como proteína de fase aguda foi já estudada, a função da DAP no tecido decidual não é ainda conhecida. Por forma a esclarecer algumas destas questões foram realizados estudos estruturais a nível do DNA e da cadeia oligossacarídica e estudos funcionais de modo a determinar as possíveis diferenças entre as duas formas de α 2M. A nível do DNA estudamos a sequência correspondente à "bait region" da DAP, região que apresenta diferenças estruturais entre os vários membros da família das α 2-macroglobulinas, sendo a restante sequência altamente conservada. Os nossos resultados demonstraram total homologia entre as sequências de DNA correspondentes às "bait regions" da DAP e da AMF. A nível da cadeia oligossacarídica verificamos a existência de uma diferença no conteúdo em ácido siálico sugerindo modificações pós-tradução.

No ser humano a α 2M é uma proteína circulante, e que recentemente se descobriu ser também sintetizada pelo endométrio durante o ciclo menstrual, não se sabendo ainda se é sintetizada durante a gravidez. A α 2M é um inibidor de todas as classes de proteases e uma proteína que liga várias citocinas e factores de crescimento. O ambiente uterino durante a gravidez é local de processos de multiplicação, diferenciação e remodelação celular que envolvem a acção de proteases, citocinas e factores de crescimento. Assim, testámos a capacidade da α 2M do rato, quer a forma decidual quer a forma hepática, ligar a interleucina-6 (IL-6), citocina indutora da síntese de α 2M pelos hepatócitos e existente na interface materno fetal. Estudámos ainda a possibilidade de ligação ao factor de crescimento tipo insulina - IGF-I, factor envolvido na proliferação e diferenciação das células deciduais e trofoblásticas. Os resultados demonstraram que ambas as formas de α 2M ligavam a IL-6 e o IGF-I com a mesma intensidade, parecendo não existir diferenças funcionais. No entanto, enquanto que com a IL-6 não havia necessidade da presença de

proteases para ocorrer a ligação, com o IGF-I só se estabelecia a ligação na presença de tripsina durante a reacção de incubação.

Para tentar esclarecer a relação entre a DAP e os seus ligandos e a sua função durante a gravidez, realizámos um estudo temporal e espacial da expressão do mRNA codificante para a DAP e para os seus ligandos, o IGF-I e o IGF-II, por hibridização *in situ*. O início da expressão da DAP ocorreu no 8º dia de gravidez nas células decíduais da decidua lateral. Durante o resto da gravidez a expressão manteve-se na decidua mesometrial, sendo especialmente intensa junto às zonas onde ocorria a invasão pelo trofoblasto e na glândula metrial. Os tecidos placentários não apresentavam expressão. Os mRNAs codificantes para os IGFs detectaram-se nos tecidos maternos na fase inicial da formação da decidua e na placenta sugerindo um envolvimento destes no desenvolvimento da placenta. A síntese destes factores na placenta ocorria em locais contíguos aos da expressão do mRNA codificante para a DAP. Esta localização anatómica de justaposição da DAP aos seus ligandos sugere que a DAP controla a acção dos IGFs durante a gravidez apoiando assim os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*.

A capacidade de ligação da DAP a proteases, à IL-6 e ao IGF-I e o padrão temporal e espacial de expressão da DAP e seus ligandos sugere o possível envolvimento da DAP na regulação das interações materno-fetais e no estabelecimento da placenta.

ABSTRACT

Decidualization-associated-protein (DAP) is the major secretory product of the mesometrial decidua in the rat. This glycoprotein is an α 2-macroglobulin, physicochemical and immunochemical identical to the α 2 acute-phase macroglobulin-alphamacrofetoprotein (AMF), which rises sharply in plasma concentration in inflammation and tissue injury. This glycoprotein is synthesized by the liver and decidua and is not known if it is a product of identical genes or if it is subjected to post-translational modifications. The function of AMF has already been studied while the function of DAP in the decidua is unknown. In an attempt to elucidate some of these aspects we performed structural studies, at the DNA level and at the oligosaccharide chain, and functional studies, in order to determine possible differences between the two forms of α 2M. At the DNA level we have studied the sequence that corresponds to the bait region of DAP, region that varies among all the members of the α -macroglobulin family as the rest of the sequence is highly conserved. Our results demonstrate total homology between the DNA sequences corresponding to DAP and AMF bait regions. At the level of the oligosaccharide chain we found differences in the sialic acid content, suggesting post-translational modifications.

Human α 2M is present in the circulation and recently, it has been reported to be synthesized by the non pregnant endometrium but it is not known its function or if it is produced during pregnancy. α 2M is a broad spectrum protease inhibitor that has also cytokine binding properties. The uterine environment during pregnancy is a local of multiple processes of cellular multiplication, differentiation and remodeling involving proteases and cytokines. Therefore, we tested the ability of liver- and decidual-derived α 2M in the rat to bind interleukin-6 (IL-6), cytokine that induces the synthesis of α 2M by the hepatocytes and exists in the materno-fetal interface. We also studied the possibility of binding to the insulin-like growth factor-I (IGF-I), a growth factor involved in the proliferation and differentiation of decidual and trophoblast cells. The results demonstrate that both forms of α 2M bind IL-6 and IGF-I with similar intensity, suggesting the absence of functional differences. However, in the case of IL-6, binding occurred even in the

absence of proteases while the binding of IGF-I was mainly dependent upon the coincubation of the protein with a protease.

To provide an insight into the relationship between DAP and its putative ligands and their function during pregnancy we studied the patterns of expression of mRNA encoding DAP and IGFs in the rat uterus by *in situ* hybridization. Expression of mRNA encoding DAP was first detected on day 8 of pregnancy in decidual cells of the lateral decidua. Throughout the remainder of pregnancy, expression occurred in the mesometrial decidua and metrial gland and was particularly strong around the ectoplacental cone and blood vessels that were invaded by the trophoblast. The expression for mRNAs encoding IGFs was detected in the initial phase of decidualization and in the placenta suggesting an involvement of these factors in placental development. Their synthesis in the placenta occurred in close apposition to the locals where DAP mRNA was being synthesized. This anatomical apposition of DAP and its ligands suggests that DAP controls IGFs actions during pregnancy supporting the results obtained *in vitro*.

DAP binding properties to proteases, IL-6 and IGF-I and the spatial and temporal patterns of expression of DAP and its ligands suggests a role for DAP in mediating fetal-maternal interactions and the establishment of the placental structure.

RÉSUMÉ

La protéine associée à la décidualisation (DAP) est le principal produit de sécrétion du tissu décidual du rat. Cette glycoprotéine est une α 2-macroglobuline (α 2M) possédant des propriétés physico-chimiques identiques à l'alfamacrofoetoprotéine (AMF), protéine de la phase-aiguë et dont la concentration augmente en cas d'inflammation et de lésion des tissus. De cette façon, chez le rat cette glycoprotéine présente deux origines tissulaires, une origine hépatique et une origine déciduale. On ne sait si ces deux origines correspondent à des gènes identiques ou si ce sont les résultats de modifications post-traductionnelles. Bien que la fonction de la AMF soit connue, on ignore la fonction de la DAP dans le tissu décidual. Pour répondre à ces questions, nous avons étudié la structure du DNA et de la chaîne oligosaccharidique, ainsi que les fonctionnalités différentes des deux formes de α 2M. Au niveau du DNA nous avons étudié la séquence correspondant à la "bait region" du DAP et de l'AMF, région qui présente des différences structurales entre les membres de la famille des α -macroglobulines, puisque le reste de la séquence est largement conservé. Les résultats démontrent une homologie totale entre les séquences du DNA correspondantes aux "bait regions" de la DAP et de l'AMF. Au niveau de la chaîne oligosaccharidique nous avons vérifié l'existence des différences dans le contenu en acide sialique ce qui suggère une modification post-traduction.

Chez l'Homme l' α 2M est une protéine circulante, récemment découverte dans l'endomètre pendant le cycle mais dont l'existence durant la grossesse et la fonction n'ont été précisées. L' α 2M est un inhibiteur de protéases et une protéine qui se lie aux cytokines. L'utérus pendant la grossesse est un lieu de multiplication et de différenciation cellulaires. Ainsi, nous avons testé la capacité de l' α 2M du rat dans ses formes hépatique et déciduale pour se lier à l'interleukine-6 (IL-6), interleukine inductrice de la synthèse de l' α 2M par des hépatocytes et qui est présente dans l'interface materno-fœtal. Nous avons aussi testé la possibilité de liaison au facteur de croissance du type insuline (IGF-I) qui est important pour la prolifération et la différenciation des cellules déciduales et trophoblastiques. Les résultats démontrent que les deux formes se lient à IL-6 et à IGF-I avec la même intensité, ce qui suggère l'absence de différences fonctionnelles.

Cependant, alors que dans le cas de l'IL-6 la liaison a lieu malgré l'absence de protéases, il en va autrement dans le cas de l'IGF-I qui nécessite la présence de protéases pour se lier.

Pour éclairer la relation entre la DAP et ses molécules de liaison durant la grossesse, nous avons fait une étude temporelle et spatiale des mRNAs codant pour la DAP et les IGFs, par la technique d'hybridation *in situ*. Le début de l'expression pour la DAP a été observée au 8^e jour de gestation dans les cellules déciduales de la région déciduale latérale. Pendant le restant de la gestation, la localisation a été limitée à la région déciduale mésométriale et glande métriale, l'intensité étant élevée dans les régions envahies par les cellules trophoblastiques. La localisation des IGFs a été observée dans les tissus maternels pendant la phase initiale de formation du tissu décidual et dans le placenta, ce qui suggère son engagement dans le développement du placenta. La localisation se vérifie dans les zones tout près de celles qui expriment la DAP. Cette localisation anatomique de juxtaposition de la DAP aux IGFs suggère le contrôle des actions de ces facteurs et appuie les résultats obtenus *in vitro*.

Le fait que cette protéine lie les protéases et cytokines ainsi que la localisation anatomique de la DAP et d'IGFs suggère son rôle dans la régulation des interactions materno- fœtales et dans l'établissement du placenta.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Características morfológicas do útero no Rato

O útero é um órgão composto por três camadas, o endométrio, o miométrio e uma serosa externa ou perimétrio.

O miométrio corresponde à parte muscular do útero sendo constituída por uma camada muscular circular interna e uma longitudinal externa. O endométrio é constituído por um epitélio luminal que rodeia o lúmen uterino, um epitélio glandular que invagina para dentro do estroma e células do tecido conjuntivo do estroma tipo fibroblásticas que formam a matriz para suporte das glândulas. Nos roedores, o endométrio pode ser dividido em dois pólos ou zonas, o mesométrio e o antimesométrio, relativamente ao mesentério uterino (Fig. 1).

As células do epitélio luminal são colunares, possuem numerosas microvilosidades, um retículo endoplasmático e um complexo de Golgi bem desenvolvidos. As células epiteliais estão interligadas por complexos juncionais, que, provavelmente, impedem a passagem directa de materiais entre o lúmen e o estroma. As células do estroma são tipo fibroblásticas, caracteristicamente fusiformes, com núcleo de forma irregular, possuem microvilosidades, algumas inclusões lipídicas e abundantes ribossomas livres. Ocasionalmente, existem contactos entre células vizinhas.

O endométrio está sujeito à influência das hormonas esteróides (o estrogénio e a progesterona) produzidas no ovário. Estas hormonas fazem variar os tipos e estados de diferenciação das células de dia para dia, mesmo de hora para hora, no ciclo estral (ciclo de 4 dias) e no começo da gravidez. Na rata jovem, o ciclo é constituído por quatro fases que se podem distinguir pelo tipo de células presentes nos esfregaços vaginais: a fase de proestro, a fase de estro que corresponde ao momento da ovulação, a fase de metestro e a de diestro.

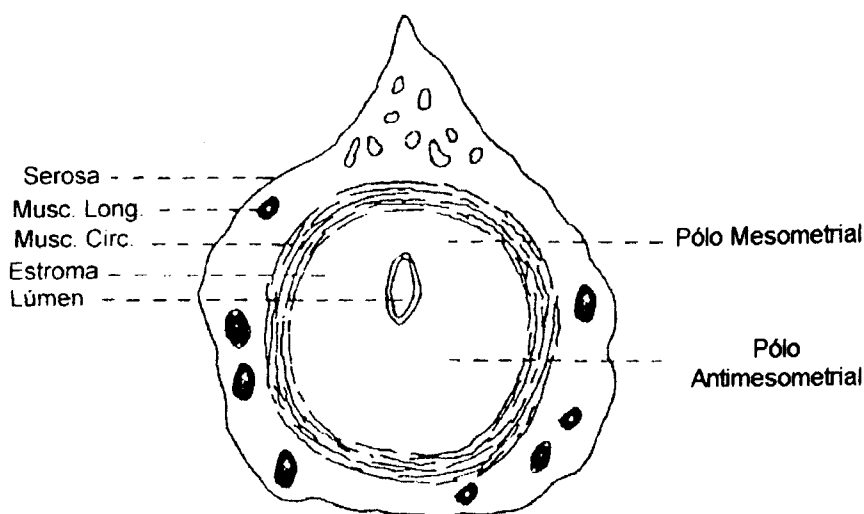


Figura 1- Esquema de um corte transversal de um útero não grávido (rato), demonstrando a localização anatômica do endométrio, miométrio e perimétrio.

2. Preparação do útero para a implantação

Na maioria dos mamíferos o endométrio está preparado para a implantação após cada ovulação. No entanto, o útero só permite a implantação do blastocisto se o endométrio já estiver preparado por acção das hormonas do ovário, o estrogénio e/ou a progesterona. A sequência no tempo e as concentrações destas hormonas são fundamentais no desenvolvimento da receptividade do útero. No rato e ratinho, para que o útero tenha atingido um estado de receptividade no momento em que o blastocisto está pronto a aderir, deverá ter sido exposto à acção da progesterona pelo menos durante 48 hs, devendo seguir-se uma exposição ao estrogénio. No entanto, o estrogénio não é essencial para a implantação e na sua ausência o útero pode ficar receptivo desde que sofra uma acção prolongada da progesterona (Psychoyos, 1973).

No rato e ratinho, a sensibilização do útero para a implantação decorre no período de 3-4 dias após a ovulação. Durante esse período, os três principais tecidos do endométrio (o epitélio luminal, o epitélio glandular e o estroma) sofrem mitoses em tempos diferentes. Este tipo de resposta depende de uma prévia exposição à progesterona, por 48hs, e a uma dose de estrogénio. No dia 3, as mitoses estão restritas à zona do

estroma subepitelial no antimesométrio e ao mesmo tempo podem também observar-se mitoses no miométrio (revisão em O'Grady e Bell, 1977). No 4º dia, as células do estroma sofrem mitoses e atingem um máximo às 24hs após tratamento com estrogénio. Somente após este ciclo mitótico pode ocorrer a implantação. Tratamentos que atrasem ou previnam as mitoses no estroma também retardam ou impedem a implantação (Heald, 1976).

O tempo de máxima receptividade ocorre 24hs após a secreção do estrogénio de nidacão e corresponde ao período de mitoses máximo no estroma periluminal. De facto, a receptividade ao blastocisto está limitada a um curto período (De Feo, 1967; Psychoyos, 1973; Finn e Martin, 1974), correspondente a algumas horas entre a manhã e a tarde do 5º dia de gravidez, seguindo-se um período refractário que interfere com a sobrevivência do zigoto e bloqueia a implantação por indução de um ambiente hostil para o blastocisto (Psychoyos, 1973; O'Grady e Bell, 1977).

3. Implantação

A implantação define-se como o processo que origina a morfogénese da placenta, após contacto apropriado entre os tecidos blastocitários e maternos. Este processo é correntemente observado em espécies onde ocorre a invasão pelo trofoblasto, isto é, quando ocorre a degradação dos tecidos maternos, como acontece no caso da placentação de tipo hemocorial existente no Homem e no Rato. Logo no início da implantação o endométrio sofre a chamada reacção decidual ou decidualização que consiste na diferenciação das células do estroma do endométrio em células deciduais formando o tecido decidual ou decidua. Este fenómeno tem início na zona onde o blastocisto se implanta propagando-se posteriormente pelo endométrio. Do ponto de vista biológico, o principal acontecimento na implantação é a formação de um contacto íntimo entre o endométrio e o trofoblasto que representa a aderência de uma população antigenicamente estranha, o que transforma o início da gravidez num apaixonante objecto de estudo. No entanto, as bases moleculares que regulam este processo não estão ainda esclarecidas. Para que a implantação ocorra tem de existir simultânieidade cronológica entre a

predisposição para a invasão por parte do trofoblasto e o estado de receptividade uterina. Enquanto que a receptividade do endométrio é regulada pelas hormonas esteróides do ovário (progesterona e alterações da razão estrogénio/progesterona), a propriedade invasiva é adquirida pelo trofoblasto quando este atinge um determinado grau de diferenciação (revisão em Abrahamsohn e Zorn, 1993).

A iniciação da implantação requer que as células trofoblásticas adiram, via membrana apical, à membrana apical das células epiteliais do endométrio. No Rato, a implantação inicia-se no antimesométrio ao 5º dia de gestação (Schlafke e Enders, 1975) (Fig.2). O blastocisto entra em justaposição com o epitélio uterino e aumentam os contactos entre as microvilosidades da superfície das células trofoblásticas e da superfície das células epiteliais, levando à interdigitação das microvilosidades e ficando as superfícies das células trofoblásticas e epiteliais paralelas. É nesta fase que a continuação da implantação depende da secreção de estrogénio que vai actuar no endométrio já preparado pela progesterona. As células do epitélio luminal onde o blastocisto adere sofrem apoptose (Parr e col., 1987), destacando-se da sua membrana basal e prolongamentos das células trofoblásticas penetram entre elas, até que todo o trofoblasto se instala sobre a membrana basal que finalmente desaparece, não se sabendo ainda por que processo. O trofoblasto fica, então, em contacto com o tecido conjuntivo do endométrio cuja região subepitelial está agora transformada em tecido decidual. A invasão do trofoblasto resulta sobretudo da população de células gigantes do trofoblasto que penetram entre as células deciduais. O trofoblasto continua a proliferar formando o cone ectoplacentário. Este consiste num núcleo de células trofoblásticas que proliferam e que estão rodeadas por células gigantes secundárias do trofoblasto em diferenciação. São estas células que invadem a decidua para formar a parte fetal da placenta.

O desenvolvimento da placenta hemocorial resulta do crescimento do cone ectoplacentário, diferenciação das suas células e formação de uma associação entre elas e células de origem alantóica. Assim, o início da implantação envolve um intercâmbio entre o epitélio da trofectoderme do blastocisto e o epitélio luminal do útero. Embora esta interacção dependa primariamente dos efeitos coordenados da progesterona e estrogénio, o mecanismo pelo qual este processo é regulado pelos esteróides não é ainda completamente conhecido. O epitélio uterino é um mediador que possui um papel chave

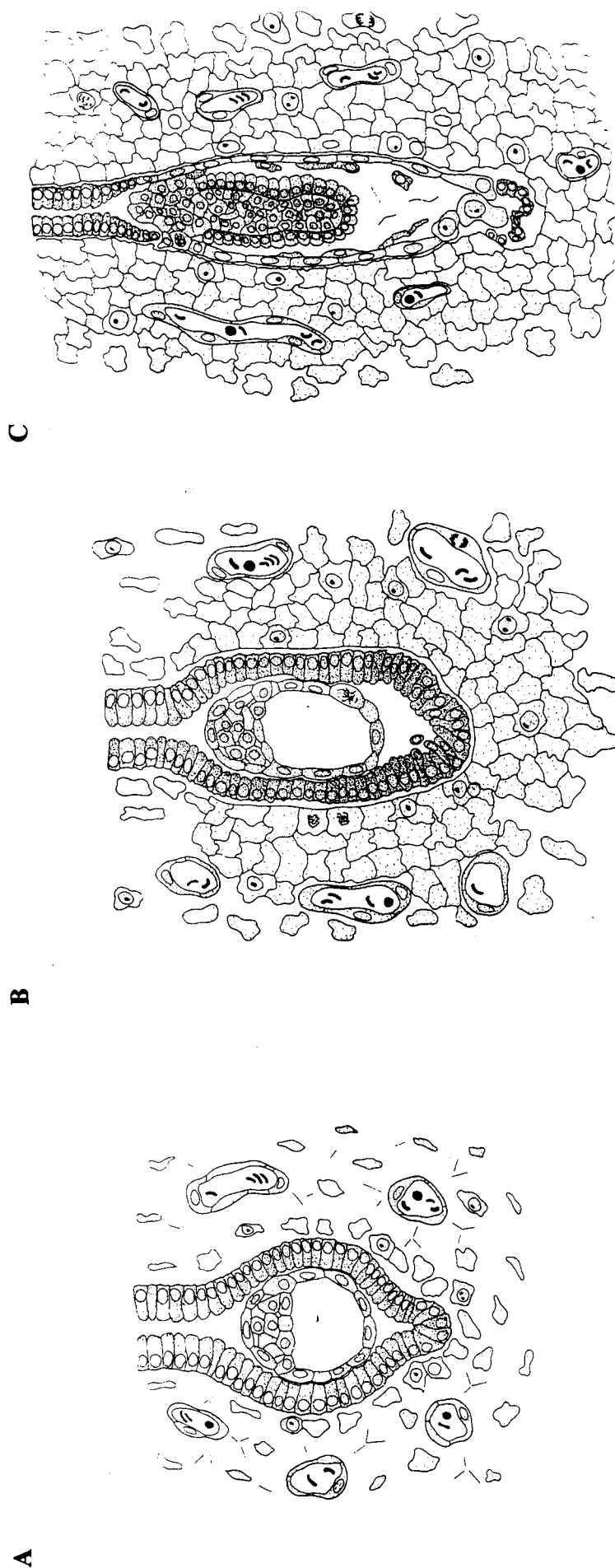


Figura 2- Representação esquemática de três fases da implantação correspondentes aos dias 5, 6 e 7. **(A)**- Dia 5: O útero, edematoso, envolve o blastocisto. Este está em íntima união com o epitélio uterino no antimesométrio. As células epiteliais, no seu pólo apical, seguem rigorosamente os contornos das células trofoblásticas. Podem ser observadas algumas alterações nos fibroblastos do estroma à volta do local de implantação. Há uma modificação morfológica para uma forma mais cuboide e algumas células estão já unidas umas às outras paralelamente ao lúmen uterino. **(B)**- Dia 6: O blastocisto sofreu um alongamento. Ocorrem mitoses no blastocisto, nas células do estroma e nas células endoteliais. No antimesométrio o epitélio apresenta-se irregular. Os fibroblastos transformaram-se em células decíduais, formando uma camada contínua à volta do epitélio. **(C)**- O epitélio deixou de estar presente nas margens laterais do lúmen uterino. A decidualização do estroma é extensa isolando o restante do epitélio uterino e os vasos sanguíneos do estroma. É durante este período que as células trofoblásticas entram em contacto com o estroma. (Adaptado de Enders e Schlafke, 1967).

na receptividade ou não receptividade do endométrio. Se o epitélio for removido não ocorre a indução da reacção decidual (Lejeune e col. 1981). Por outro lado, blastocistos em estado de implantação invadem profundamente o hospedeiro se forem transplantados para locais ectópicos (Kirby 1963). Deste modo, o epitélio uterino, para além de servir como barreira para a penetração do trofoblasto quando em estado não-receptivo, serve também como transmissor entre os sistemas embrionários/maternos, emitindo sinais que viabilizam o início da implantação e da decidualização.

Tendo em conta estes conceitos e conhecimentos será então importante perguntar quais são as bases moleculares das alterações que o epitélio uterino sofre quando entra na fase receptiva.

Nas células epiteliais do endométrio em estado receptivo observa-se uma redução da espessura do glicocálix e a expressão de novas proteínas de superfície. Porém, pouco se sabe sobre a natureza das moléculas envolvidas e/ou se a adesão entre o epitélio uterino e o trofoblasto é mediada por moléculas de adesão ("cell adhesion molecules"-CAMs e "substrate adhesion molecules"-SAMs) ou outras moléculas. De facto, MacCalman e col. (1996) observaram que a expressão da caderina 11 aumentava à medida que as células do estroma sofriam decidualização. Além disso, esta molécula estava também localizada no trofoblasto, levando estes autores a proporem o seu envolvimento nas interacções trofoblasto-endométrio como âncora entre a decidua e as células trofoblásticas frenando a sua invasão. As mudanças no epitélio, para que o trofoblasto possa aderir ao seu pólo apical, são de tal modo complexas envolvendo mudanças da polaridade celular, que Denker (1993) propôs a ocorrência neste processo de uma completa alteração da expressão do fenótipo epitelial, responsável pela ausência de um pólo apical e de um pólo basal. Essa mudança de comportamento das células epiteliais poderia ser mediada pela acção das hormonas esteróides (directamente ou indirectamente através do estroma do endométrio). Estas mudanças são particularmente evidentes no local onde se aloja o blastocisto (câmara de implantação), sugerindo que sinais locais provenientes do blastocisto poderão ter uma acção ainda mais eficiente na resposta que os esteróides maternos. A natureza destes sinais constitui presentemente matéria de estudo, podendo certamente incluir a influência de citoquinas e factores de crescimento, embora pouco se

conheça sobre o mecanismo transmissor de sinais do embrião ou sobre a natureza e significado das respostas maternas.

As células trofoblásticas sofrem também uma desorganização da sua polaridade diferenciando-se numa forma de tipo invasivo. Mas, em contraste com os tumores malignos, e apesar de utilizarem mecanismos invasivos muito semelhantes aos das células tumorais com erosão das membranas basais por serino e metaloproteases, as células invasoras do trofoblasto são estritamente controladas na sua invasão *in situ* dos tecidos maternos. Na gravidez é fundamental a penetração da membrana basal do epitélio uterino pelas células trofoblásticas para a implantação e a invasão dos vasos sanguíneos que permitem o estabelecimento das trocas materno-fetais. Uma invasão estritamente controlada é decisiva para o sucesso de uma gravidez, já que uma fraca invasão resultará em trocas materno-fetais inadequadas, enquanto que uma invasão excessiva resulta numa destruição patológica do útero como acontece no desenvolvimento do coriocarcinoma, a forma maligna do trofoblasto. Bell (1983) sugeriu que o controlo da invasão trofoblástica seria mediado pelo tecido decidual, que se forma em resposta à implantação. Mais tarde, Lala e Graham (1990) sugeriram que o factor transformador de crescimento ("transforming growth factor β 1-TGF β 1) e o inibidor de metaloproteases ("tissue inhibitor of metaloproteinases"-TIMP), produzidos pela decidua, seriam os responsáveis por esse controlo.

A expressão neste período de diversos factores de crescimento e seus receptores no útero e/ou embrião sugere que os mesmos podem influenciar o ambiente uterino e/ou embrionário e funcionarem de modo autócrino/parácrino. Seria, então, de toda a importância analisar a expressão temporal e espacial dos factores de crescimento e dos seus receptores para melhor entender o papel do sinal ligando-receptor na implantação.

A implantação do blastocisto provoca no endométrio um tipo de resposta muito semelhante à resposta obtida num processo inflamatório. Esta resposta inclui a produção de prostaglandinas, a dilatação e aumento de permeabilidade capilar, a exsudação de plasma e a infiltração de vários tipos de leucócitos. No ratinho, por exemplo, é visível a acumulação de polimorfonucleares no estroma do endométrio adjacente ao local de implantação do blastocisto. Como noutros processos inflamatórios, a acumulação de leucócitos nas áreas de implantação envolve uma série de complexas interacções entre os

diversos tipos de células, assim como a produção de várias citocinas. Por outro lado, as várias células do endométrio produzem numerosas citocinas, como o factor inibidor leucémico ("leukemia inhibitor factor"-LIF), o factor estimulante da formação de colónias ("colony-stimulating factor 1"- CSF-1), o factor de necrose tumoral- α ("tumor necrosis factor"-TNF α), a interleuquina-6 (IL-6) e a interleuquina-1 (IL-1) que foram considerados como importantes para a implantação do blastocisto (Stewart, 1994; Pollard e col., 1991; Simon e col., 1994; Todt e col., 1996). Destes o TNF α , a IL-6 e a IL-1 parecem ser essenciais nos locais de inflamação dado que a sua síntese ocorre em cascata: o TNF α é secretado em primeiro lugar, seguido da IL-1 e da IL-6. O TNF α e a IL-1 estimulam a produção de IL-6 e esta, por seu lado, inibe a secreção de TNF α e IL-1 tendo assim um papel importante no controle da resposta inflamatória (Akira e col., 1990; Chrousos, 1995). A IL-1 e o TNF- α induzem a síntese de moléculas de adesão, a síntese de prostaglandina E₂ e provocam edema. A IL-1, a IL-6 e o TNF α modelam a proliferação celular. No útero de ratinho a bioactividade da IL-1 aparece muito aumentada entre o 4º e o 5º dia, isto é, durante o período de implantação (De e col., 1993). Este aumento de bioactividade é paralelo ao aumento da produção de prostaglandinas durante este período. Por outro lado, as células do estroma do endométrio humano demonstram um aumento de produção de prostaglandinas quando estimuladas com IL-1 (Semer e col., 1991).

No rato e ratinho uma das primeiras mudanças observadas no estroma após implantação é um grande aumento na permeabilidade vascular (Psychoyos, 1960; Finn e MacLaren, 1967), que pode ser nitidamente observado após a administração intravenosa de corantes de elevado peso molecular como o azul de pontamina (Psychoyos, 1960). O aumento de permeabilidade capilar é rapidamente seguido pelo desenvolvimento de edema no estroma, sob o blastocisto, na área onde se encontram altos índices mitóticos (Finn 1977). As modificações da permeabilidade nos vasos sanguíneos e consequente edema do estroma precedem todos os eventos que levam ao completo desenvolvimento do tecido decidual.

4. Decidualização

A decidualização é uma resposta do útero ao embrião ou a determinados estímulos artificiais que ocorre em várias espécies, embora a extensão da reacção de decidualização seja variável. Este fenómeno induz modificações morfológicas que resultam na transformação das células do estroma do endométrio em células deciduais, originando a formação do tecido decidual ou decidua. Na maioria dos animais, a resposta é dependente da presença do blastocisto e na mulher a decidualização é também observada na fase secretora do ciclo. A reacção decidual pode também ser induzida artificialmente em resposta a um estímulo como o óleo ou trauma (De Feo 1967), chamando-se neste caso deciduoma ao novo tecido. As alterações morfológicas observadas são aparentemente idênticas, sugerindo que o embrião por si só não exerce uma influência específica.

Assim, a decidualização em roedores tem características importantes: 1) as células do estroma do endométrio têm de estar adequadamente preparadas, isto é, terem sofrido a influência das hormonas esteróides; 2) ocorre somente à volta dos embriões em implantação, deixando sem modificações as regiões de endométrio entre os embriões; 3) pode ser induzida artificialmente na ausência de embrião, resultando na formação de um tecido, o deciduoma, muito similar à verdadeira decidua; 4) existe um intervalo de tempo muito definido no qual a decidualização pode ser induzida em animais grávidos ou pseudográvidos; 5) resulta na morfogénese de um novo tecido, o tecido decidual.

As razões que levam a que células tipo fibroblásticas do estroma iniciem um processo de diferenciação em células deciduais ainda não está perfeitamente esclarecido. Sabe-se no entanto que este fenómeno é essencial para um normal desenvolvimento e função da unidade fetoplacentária nas espécies que apresentam placentação do tipo hemocorial.

Em ratos pseudográvidos e ovariectomizados, mantidos em certos regimes hormonais, diversos estímulos, como a injeção intraluminal de óleo ou a raspagem com uma agulha (De Feo, 1967), resultam na formação de um deciduoma. No entanto, a sequência de eventos que se seguem após administração de um estímulo no lúmen uterino ainda não é totalmente conhecida. O facto de substâncias como o óleo e polissacarídeos poderem induzir a decidualização quando injectados no lúmen uterino, sugere que estes

compostos actuam inicialmente na face apical do epitélio (De Feo 1967). Pensa-se que o epitélio uterino actua como transdutor do estímulo, dado que não foi possível induzir a decidualização em úteros de ratos que sofreram remoção dos epitélios (Lejeune e col. 1981).

Embora sem sucesso, foram já realizadas várias experiências em que se injectavam substâncias no lúmen uterino na tentativa de se identificar o mediador indutor da decidualização. Contudo, a hipótese mais provável aponta para a existência de uma sequência de eventos que envolve diferentes mediadores. Neste sentido, verificou-se que a resposta a um estímulo traumático envolve elementos de resposta inflamatória, proliferação celular, aumento de permeabilidade vascular e síntese de moléculas como as prostaglandinas e histamina, o que sugere que estes elementos poderão representar alguns dos mediadores envolvidos na decidualização causada por estímulos não-traumáticos e blastocisto. De facto, vários autores ligaram as prostaglandinas ao processo de decidualização. A administração local de prostaglandinas, a ratos tratados com estrogénio e progesterona, estimulava a decidualização, enquanto que a administração de indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, impedia a decidualização (Kennedy e Lukash, 1982). Parr e col. (1988) observaram, por imunocitoquímica no útero de rato, que a enzima prostaglandina sintetase que converte o ácido araquidónico em prostaglandina H₂, apresentava uma expressão intensa no epitélio do útero nos dias 4 e 5 de gravidez. As células do estroma subepiteliais também apresentavam marcação, mas as situadas mais profundamente no estroma, só apresentavam sinais no 6.^o dia. Estes resultados realçam a importância do epitélio luminal no desencadear da reacção decidual e podem, ainda, apontar para um mecanismo parácrino de indução decidual, em que as primeiras células a decidualizarem (na zona decidual primária) actuam sobre as de localização mais periférica. A observação de que no útero humano as células do epitélio glandular secretam quantidades significativamente maiores de prostaglandinas que as do estroma sugere uma interacção de tipo parácrino entre estes dois tipos de células. De facto, *in vitro*, as prostaglandinas exercem uma acção importante na diferenciação das células do estroma do endométrio humano em células deciduais (Frank e col., 1994).

O factor activador das plaquetas ("platelet activating factor"-PAF) foi apontado como estando envolvido na implantação e decidualização. Uma injeção uterina de PAF

provoca a indução da decidualização. No entanto, a administração de indometacina demonstra que os efeitos do PAF são, de facto, mediados pelas prostaglandinas, já que o PAF provoca um aumento da síntese destas moléculas. No entanto, uma interacção parácrina entre o PAF e as prostaglandinas poderá ser importante na regulação da reacção decidual, mas não como estímulo inicial para a decidualização (revisão em Harper 1989). Por outro lado, Bany e Kennedy (1995) verificaram que a IL-1 α e o factor de crescimento epidérmico ("epidermal growth factor"-EGF) estimulavam a produção de prostaglandinas pelas células deciduais. Assim, a IL-1 α que é secretada pelo epitélio uterino poderá actuar de modo autócrino e parácrino regulando a produção de prostaglandinas. No entanto, o papel dos factores de crescimento durante a decidualização é um campo onde toda a informação é muito recente, não se sabendo exactamente de que forma estas moléculas actuam na indução e manutenção da decidualização e no desenvolvimento do embrião.

5. Aspectos morfológicos da decidua e placenta

A decidua do rato não é uma estrutura homogénea mas um órgão complexo e diferenciado. Em resposta a um estímulo decidual, no rato e ratinho, as células do estroma uterino diferenciam-se em células deciduais, formando as regiões deciduais do antimesométrio e do mesométrio, com características celulares e temporais próprias. Durante a decidualização surgem três tipos de células: as células deciduais do antimesométrio, as células deciduais do mesométrio e as células granulares da glândula metrial (De Feo, 1967).

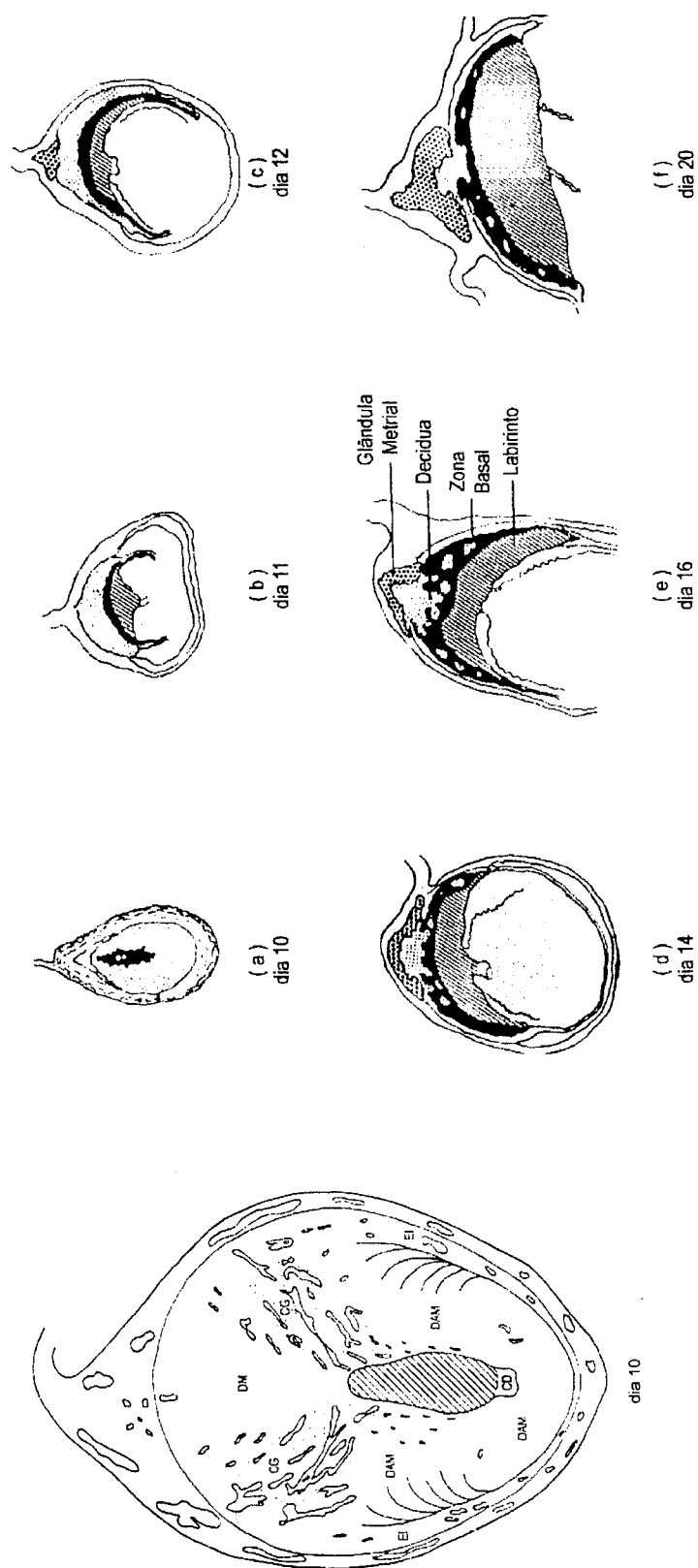
Welsh e Enders em 1985, descreveram várias regiões de transformação decidual no 10^o dia de gravidez, dia em que a decidualização atinge o seu nível máximo de complexidade e diferenciação: a decidua antimesometrial, a decidua mesometrial, a decidua lateral (região de células ricas em glicogénio) e a região do estroma indiferenciado. O desenvolvimento destas três regiões ocorre sequencialmente e está relacionado com as fases de desenvolvimento das populações trofoblásticas (Fig.3).

A implantação do blastocisto ocorre no antimesométrio no 5^o dia de gravidez. As primeiras células a sofrerem diferenciação são os fibroblastos do estroma do

antimesométrio subepitelial à volta do blastocisto, onde já tinham ocorrido divisões. Dá-se assim origem às células decíduais do antimesométrio da zona decidual primária, células grandes, redondas, basófilas, multinucleadas e de nucléolos proeminentes. Subsequentemente, o estroma mais interno divide-se e decidualiza em células decíduais do antimesométrio (O'Grady e Bell, 1977). Esta zona fica rodeada por uma região de células decíduais maduras às quais se seguem as células mais afastadas do embrião que têm uma morfologia intermédia entre células decíduais e fibroblastos e que se chamam células pré-decíduais. Estas, por sua vez, são rodeadas de uma camada de fibroblastos adjacentes ao miométrio, que não se diferenciam (Welsh e Enders, 1985). Esta região do estroma não decidualizado está separada das células pré-decíduais por uma camada muito compacta de fibroblastos, a chamada cápsula fibrinóide (Bulmer e Dickson, 1961) ou cápsula (Welsh e Enders, 1985). Usando timidina tritiada, Kleinfeld e O'Shea (1983) mostraram que estas células sobreviviam à involução da decidua e realizavam a repopulação do endométrio após o parto. No 9º dia de gestação, a decidualização já atingiu as regiões junto à camada muscular circular. No 11º dia a decidua antimesometrial já regrediu para formar a decidua capsular enquanto que a decidua mesometrial está em expansão.

A decidualização no mesométrio ocorre mais lentamente. Um ou dois dias após a diferenciação das células do antimesométrio, as células decíduais do mesométrio (de aspecto estrelado, com prolongamentos citoplasmáticos e mononucleadas) surgem por diferenciação de células do estroma mesometrial. Inicialmente localizam-se na região central do mesométrio onde formam o cone decidual (Welsh e Enders, 1985). As primeiras células a sofrerem diferenciação são as situadas junto ao epitélio na cripta de implantação, seguindo-se a decidualização em sentido centrífugo até ao miométrio. A cápsula fibrinóide existente na região do antimesométrio, não se estende ao mesométrio (Welsh e Enders, 1985), embora se encontre uma camada de fibroblastos do estroma não decidualizado, desde o antimesométrio até ao mesométrio junto à camada muscular circular.

Na zona do endométrio, entre a decidua mesometrial e a antimesometrial, encontra-se a decidua lateral que contém a região das células ricas em glicogénio descrita



DM- Decidua mesometrial; DAM- Decidua antimesometrial; CG- Área das células ricas em glicogênio; EI- Estroma indiferenciado; CD- Cripta decidual

Figura 3- Proporções relativas das várias zonas da decidua, glândula metrial e placenta durante a gravidez (adaptado de Davies e Glasser, 1968 e Welsh e Enders 1985). No 10º dia, o útero pode dividir-se em várias regiões: na decidua antimesometrial que forma uma câmara contendo o embrião, na decidua mesometrial, numa região de células decíduais ricas em glicogênio entre a decidua mesometrial e antimesometrial e numa região de células do estroma não diferenciado entre o estroma decidualizado e o miométrio. Com a progressão da gestação a decidua, extensa no início da gravidez, fica reduzida no 14º dia a uma estreita zona, a decidua basalis. A glândula metrial vai crescendo no pólo mesometrial. Na placenta observa-se um aumento da área do labirinto e da zona basal. O labirinto é a zona da placenta onde existe uma combinação de vascularização materna e fetal. O trofoblasto no labirinto é trilaminar, estando a camada mais exterior adjacente ao sangue materno e a mais interior em imediato contacto com o mesenquima fetal. A zona basal é a zona entre o labirinto e a decidua basalis que não possui mesenquima fetal e é uma área exclusivamente de vascularização materna composta maioritariamente por células citotroblásticas basófilas, pelas células gigantes do trofoblasto e pelas células de glicogênio vacuolizadas.

por Stewart e Peel (1978). Tridimensionalmente esta região tem a forma de um funil sem tubo, centrada à volta do embrião e direccionada para o miométrio. Para além do seu conteúdo em glicogénio, estas células possuem muitas organelas e complexos de união, como desmossomas e junções de hiato (Welsh e Enders, 1985). Esta região possui um abundante labirinto de vasos sanguíneos, os sinusóides laterais, com células endoteliais de núcleo saliente, resultantes da proliferação das células endoteliais e que estão em íntimo contacto com as células decíduais. Devido à presença destes vasos sanguíneos, as células decíduais estão em arranjos de cordões com a espessura de uma ou duas células. Do 9º dia ao 12º dia o cone decidual surge progressivamente mais pequeno, devido ao alargamento dos vasos sanguíneos adjacentes a esta zona e ao cone ectoplacentário que é constituído por células trofoblásticas que invadem a zona central da decidua mesometrial.

As células decíduais sofrem morte celular programada. Como já referido, elas multiplicam-se e diferenciam-se na periferia do local de implantação e depois morrem no centro, fornecendo assim um aumento progressivo de espaço para o desenvolvimento do feto. Deste modo, a decidualização envolve uma sequência espacial e temporalmente coordenada de acontecimentos com diferenciação de diversos tipos celulares (Bell, 1983).

Após o 12º dia, enquanto que a decidua mesometrial regride para formar a decidua basal e o cone ectoplacentário se desenvolve originando a placenta hemocorial, surge um terceiro tipo de população celular no triângulo mesometrial, área compreendida entre as camadas musculares interna e externa no local de ligação ao mesentério e que posteriormente se vai diferenciar em glândula metrial. Essa população é composta por células pequenas e grandes designadas por células granulares da glândula metrial (CGM). No rato e ratinho as CGM também se encontram na decidua mesometrial central após a decidualização e são raras no útero virgem e antes da implantação. No hamster e na mulher, não existe a glândula metrial mas existem os análogos destas células, as células K e os granulócitos respectivamente (Pijnenborg e col., 1974; Mincheva-Nilsson e col., 1992). As CGM parecem resultar da diferenciação de uma célula precursora da linha linfóide com origem na medula óssea (Stewart e Peel, 1978). A principal característica morfológica é a presença de numerosos grânulos citoplasmáticos que aumentam em número e tamanho durante o decurso da gravidez até cerca do dia 14. No período mediano de gestação (dias 10-12) as CGM estão em rápida divisão. Numa fase mais tardia da

gestação as figuras mitóticas tornam-se raras e as CGM mostram sinais de degeneração. Nos dias 15 e 16 iniciam-se alterações degenerativas a nível citoplasmático e nuclear, não reversíveis, culminando com o aumento de tamanho celular e ruptura. Perto do parto as CGM desaparecem do útero. Delgado e col. (1996) demonstraram que as CGM morrem *in situ* por apoptose. A libertação dos seus grânulos poderá proporcionar uma solubilização localizada da matriz extracelular, facto importante na preparação para a separação da placenta e para o nascimento (Delgado e col., 1996). Assim, a célula progenitora das GMG maduras tem capacidade de resposta aos estímulos da gravidez sofrendo divisões, diferenciação e maturação num outro tipo de célula que contém grânulos, que não se divide e que posteriormente morre por apoptose.

No entanto, pouco se sabe quanto à origem e função das células granulares da glândula metrial. Os seus grânulos citoplasmáticos contêm serino-esterases e perforina (Parr e col, 1990), proteínas citolíticas que são encontradas nos linfócitos T citotóxicos. Por isso, uma das funções que lhes é atribuída é a citotoxicidade mediada pela perforina contra células na interface materno-fetal, de modo a restringir a invasão do trofoblasto e a impedir a sua penetração na parede uterina (Parr e col., 1990). Contudo, Stallmach e col. (1995a) utilizando ratos deficientes em perforina verificaram que a falta de perforina nas CGM não alterava o decurso da gravidez. Outros estudos demonstraram que as CGM expressam marcadores de superfície encontrados nas células NK sugerindo uma relação com a linha NK (Parr e col., 1990). A confirmação de que as CGM são uma população NK foi obtida por Guimond e col. (1996) depois de utilizarem ratos transgénicos para várias linhas do sistema linfohematopoiético. As CGM produzem citocinas entre as quais o CSF-1, o LIF e a IL-1 (Croy e col., 1991). Estas citocinas são importantes para a manutenção da viabilidade celular e regulação da diferenciação. Receptores para estas citocinas foram já encontrados no trofoblasto, sugerindo assim que poderão existir interacções não líticas entre as CGM e o trofoblasto. De facto, parece existir uma relação entre o desenvolvimento das CGM e o trofoblasto. Os seus precursores aparecem após a implantação e diferenciam-se durante o desenvolvimento da placenta. No entanto, Sobis e col. (1996) demonstraram que a presença do trofoblasto parece não ser necessária ou suficiente para atrair e activar as CGM, dado que o crescimento ectópico do trofoblasto não conduz ao recrutamento de CGM, o que indica que as células trofoblásticas ou

factores secretados por elas não são activadores das CGM. Esta última situação só se verificou quando o trofoblasto foi injectado no útero, o que conduziu ao aparecimento da decidua e das CGM. A presença da decidua parece assim ser necessária para a diferenciação das CGM.

O desenvolvimento da placenta hemocorial resulta do crescimento do cone ectoplacentário e da associação das suas células com células de origem alantóica. As células da trofotoderme do blastocisto transformam-se em células gigantes do trofoblasto por volta do 5^o -6^o dia. Durante o crescimento do cone, células da periferia destacam-se formando as células gigantes do trofoblasto secundárias enquanto as outras células na região central dão origem aos outros componentes trofoblásticos da placenta (Hoffman e Wooding, 1993). As células gigantes do trofoblasto têm propriedades fagocíticas e invasivas produzindo enzimas proteolíticas. Estas células invadem a decidua e migram para os vasos maternos ocupando o lugar das células endoteliais (Welsh e Enders, 1987). Após ruptura dos vasos maternos, o sangue pode mover-se para os espaços entre as células gigantes trofoblásticas. Assim, a partir do 8^o dia o cone ectoplacentário aparece com lacunas vasculares maternas sem endotélio, sendo externamente limitado por uma camada de células gigantes. No 10^o dia, em relação com a parte superficial do cone ectoplacentário surge a mesoderme corioalantoica. Esta mesoderme é muito angioblástica diferenciando-se em mesenquima fetal e canais vasculares possuindo endotélio. A mesoderme estende-se profundamente por todo o trofoblasto do cone ectoplacentário onde já existem os canais vasculares maternos, formando assim o início do labirinto, a zona de vascularização materno/fetal (Davies e Glasser, 1968). Assim, quando a placenta está formada existem duas regiões características, o labirinto e a zona basal. A zona basal inclui uma camada de células gigantes intimamente associadas com os canais vasculares maternos que vão e vêm do labirinto e onde não existem vasos fetais.

Do 14^o ao 16^o dia ocorre uma rápida diferenciação da zona basal e do labirinto e uma regressão da decidua. A partir do 14^o dia a zona basal aparece constituída por três tipos de células: células trofoblásticas basófilas, células gigantes do trofoblasto e células glicogénicas (Davies e Glasser, 1968). As últimas são assim chamadas porque acumulam glicogénio no seu citoplasma e que por isso aparecem vacuolizadas nas colorações de rotina, formando grupos de ilhas característicos na zona basal. As células gigantes

ocupam a zona basal adjacente à decidua basal onde formam uma ou mais camadas intimamente associadas com os canais vasculares maternos. O sangue materno circula na zona basal em contacto directo quer com as células gigantes quer com as células citotrofoblásticas basófilas. No dia 16 pode reconhecer-se a organização trilaminar do trofoblasto que reveste os septos de mesenquima do labirinto. A 1ª camada é constituída por um citoplasma alongado e basófilo e está em contacto directo com o sangue materno, a 2ª é intermediária e a 3ª está em contacto com o mesenquima fetal. Os septos de mesenquima fetal são neste dia muito vascularizados por vasos fetais.

Com o avançar da gravidez há um aumento de tamanho da área do labirinto e da zona basal, mas sobretudo do labirinto. De facto, o aumento de tamanho do labirinto contribui para o aumento de tamanho da placenta atingindo um máximo perto do final da gravidez (Davies e Glasser, 1968). À medida que a placenta vai crescendo a decidua basal vai atrofiando. Depois do 14º dia, a decidua basal está reduzida a uma estreita faixa junto à zona basal.

6. Citoquinas e factores de crescimento na decidualização

As citoquinas e factores de crescimento parecem ter um papel na rápida reorganização celular, que ocorre no útero durante o início da gravidez, na diferenciação das células deciduais e da glândula metrial, no desenvolvimento da placenta e nas alterações vasculares que acompanham estes processos. Foram já identificados muitos factores de crescimento no útero e fluidos uterinos e, em alguns casos, a sua síntese parece ser regulada por hormonas esteróides. Os factores de crescimento poderão afectar processos de proliferação nas células do útero (como na angiogénese e vascularização), que podem ser importantes para a implantação e decidualização. As diferentes expressões temporais de certas citoquinas e factores de crescimento sugerem a sua influência tanto em diferentes estádios do crescimento embrionário como na invasão trofoblástica durante a formação da placenta. Por outro lado, os factores de crescimento produzidos pelo útero podem desempenhar um papel na regulação do crescimento do embrião por via parácrina. A secreção de factores para o lúmen uterino, permite a sua ligação a receptores celulares

específicos estimulando a síntese de DNA e a divisão das células do embrião em crescimento.

As citocinas podem ser sintetizadas no epitélio uterino, glândula metrial, estroma e decidua. No entanto, é difícil de determinar se as suas actividades têm origem nas populações celulares residentes ou nas populações transitórias de células hematopoiéticas. De facto, o útero contém uma grande população de leucócitos cuja distribuição responde às mudanças hormonais que ocorrem no ambiente uterino. Os macrófagos e os granulócitos têm capacidade de sintetizar citocinas, prostaglandinas e enzimas, de modo específico e de acordo com o microambiente. Estas propriedades fazem com que estas células sejam elos importantes no desenvolvimento de uma rede de citocinas que ligam as células do útero a participantes activos nos processos de remodelação na reprodução.

As células epiteliais do endométrio parecem ter um papel importante na remodelação tecidual, tal como um epitélio da pele ou das vias respiratórias numa resposta inflamatória. De facto, após a cópula existem factores no líquido seminal que desencadeiam uma cascata inflamatória no endométrio, sendo por isso crítico, nas fases iniciais da gravidez, a presença de citocinas no estabelecimento de um ambiente uterino favorável à implantação e desenvolvimento da placenta.

O epitélio uterino é a barreira que define a fronteira entre a cavidade uterina e o meio materno. Tanto os embriões em fase de implantação como o trofoblasto expressam receptores para as citocinas e/ou exibem *in vitro* respostas biológicas a citocinas derivadas das células epiteliais. Este facto, apoia a hipótese de que o epitélio poderá ser a fonte primária de reguladores parácrinos no início do desenvolvimento embrionário e placentário (Pollard, 1991; Pampfer e col., 1991). O epitélio como está na interface entre o lúmen uterino e o estroma do endométrio possui a localização ideal para proporcionar sinais regulatórios locais ao embrião em desenvolvimento e às células do estroma que sofrem diferenciação e reorganização durante a decidualização. No ratinho, o epitélio uterino na gravidez sintetiza o CSF-1 (Daiter e Pollard, 1992), o TNF- α (Yelavarthi e col., 1991), o factor transformador do crescimento β 1 ("transforming growth factor"-TGF β 1, Tamada e col., 1990), o factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos ("granulocyte macrophage colony stimulating factor"-GM-CSF), a IL-6 (Roberston e col., 1992), e o LIF (Bhatt e col., 1991). A síntese de diferentes citocinas pelas células

epiteliais, em tempos diferentes, parece indicar a existência de mecanismos específicos que controlam a sua expressão. As hormonas esteróides regulam a proliferação e a função das células do epitélio uterino bem como a secreção dos factores de crescimento como o factor de crescimento epidérmico ("epidermal growth factor"-EGF), (Huet-Hudson e col., 1990), o factor de crescimento tipo insulina ("insulin-like growth factor I"-IGF-I) (Kapur e col., 1992), o factor transformador de crescimento α ("transforming growth factor α "-TGF α) (Tamada e col., 1991) e provavelmente de CSF-1, GM-CSF e LIF. Por outro lado, o interferon- γ (IFN- γ) inibe a síntese de GM-CSF pelas células epiteliais. Isto sugere que vários factores, incluindo os de origem linfocitária, podem influenciar o tipo e tempo de secreção de citocinas por estas células sendo todo o sistema muito complexo.

Para além das células epiteliais existem outros locais de síntese de citocinas e factores de crescimento como a decidua e a glândula metrial. A glândula metrial é uma importante fonte de LIF, CSF-1 e IL-1 (Croy e col., 1991). A decidua sintetiza CSF-1, IL-6, IL-1, TGF- β 1 e TGF- β 2 (Pollard, 1991; Kauma e col., 1990). Os TGF- β s são moléculas com propriedades imunossupressoras e inibitórias do crescimento, têm a capacidade de induzir a diferenciação das formas invasivas do trofoblasto em formas não invasivas (Graham e col., 1992). Para além disso, induzem a produção de inibidores de metaloproteases (TIMP) podendo, assim, controlar a invasão do trofoblasto regulando as proteases e seus inibidores (Giudice, 1994). As células decíduais produzem ainda GM-CSF, TGF- α (Bonvissuto e col., 1992; Lysiak e col., 1993) e TNF- α (Yelavarthi e col. 1991). Estes factores podem actuar sobre as células decíduais (como um controlo autócrino) ou sobre o embrião. O TGF- α estimula o crescimento das células trofoblásticas, enquanto o TNF- α tal como o GM-CSF parece ter um papel na inibição da sua proliferação, limitando assim a invasão uterina (Yelavarthi e col, 1991; Todt e col., 1996) . O TNF- α sofre um aumento da sua concentração no plasma e no líquido amniótico em casos de pré-eclampsia (Kupferminc e col., 1994) e no plasma em casos de atraso de crescimento intra-uterino (Heyborne e col., 1992), situações que traduzem alterações na função placentária. Por outro lado, as citocinas e os factores de crescimento são capazes de modular a diferenciação (decidualização) das células do estroma *in vitro*. O factor de crescimento fibroblástico ("basic fibroblast growth factor"-bFGF) e o factor de crescimento plaquetário ("platellet derived growth factor"-PDGF)

estimulam a proliferação das células do estroma, o EGF estimula a proliferação e a diferenciação dessas células (Irwin e col., 1991) e a IL-1 α e a IL-1 β inibem a diferenciação destas células em células decíduais. A síntese de IL-1 β pelas células do estroma aumenta durante a decidualização, o que sugere que esta citocina poderá actuar de modo autócrino/parácrino na modulação do grau de decidualização (Frank e col., 1995).

De toda esta complexidade de factores que interactuam e que se interrelacionam com os diversos tecidos, quer maternos quer fetais, iremos referir especialmente a IL-6 e os factores de crescimento tipo insulina ("insulin-like growth factors"-IGFs), factores produzidos pelas células decíduais e que foram objecto de estudo no nosso trabalho.

6.1. A interleuquina-6

A IL-6 é uma glicoproteína de 26 kDa que existe em várias isoformas. É uma citocina multifuncional envolvida em processos de defesa imunológica, agressão dos tecidos, infecção e hematopoiese. A sua acção é exercida via receptores da superfície celular (revisão em Hirano, 1992).

Entre as suas múltiplas funções na coordenação das diversas facetas da defesa do hospedeiro, conta-se o seu papel indutor da síntese hepática de proteínas de fase-aguda, quer no Humem quer no Rato, e é um importante regulador da temperatura corporal. A administração de IL-6 a ratos induz uma reacção inflamatória semelhante à induzida por injeção de terebentina. De facto, no rato, a IL-6 induz a síntese do fibrinogénio, da α 1-glicoproteína ácida e da α 2-macroglobulina pelos hepatócitos (Hattori e col., 1990). A IL-6 tem múltiplas funções biológicas, tanto de proliferação como de diferenciação em células normais e malignas, e está envolvida na diferenciação terminal dos linfócitos B em plasmócitos e na activação, proliferação e maturação dos linfócitos T. A nível dos linfócitos T citotóxicos induz a síntese de perforina e serino-esterases, mediadores da lise celular.

A IL-6 é sintetizada não só por células imunocompetentes como também por fibroblastos e por células endoteliais. O mRNA codificante para a IL-6 foi localizado nas

células endoteliais da decidua no 10º dia de gravidez do ratinho (Motro e col., 1990). Durante este período da gestação ocorre a formação de novos vasos na decidua lateral onde a IL-6 poderá exercer a sua acção no processo de angiogénese. A IL-6 é produzida pelas células musculares dos vasos sanguíneos podendo ser indutora da sua proliferação. Por outro lado, a IL-6 é um factor de diferenciação das células do músculo liso. Cohen e col. (1996) propuseram que a IL-6 exercia não directamente a sua função na angiogénese, mas indirectamente através da indução do factor de crescimento do endotélio ("vascular endothelium growth factor-VEGF"). Por outro lado, e ainda segundo estes autores, a IL-6 ao induzir a síntese de $\alpha 2M$ provocava a inactivação deste factor já que o VEGF é inactivado pela ligação à $\alpha 2M$.

De e col., (1993) demonstraram a síntese da IL-6 em úteros de ratinho no período de peri-implantação tendo sido o mesmo verificado no útero pseudográvido por Choudhuri e Wood (1993). As células do estroma do endométrio humano secretam IL-6 em resposta à IL-1 α , IL-1 β , TNF e INF- γ . Por outro lado, esta secreção é inibida pelos estrogénios podendo a IL-6 estabelecer uma ponte entre o sistema endócrino e o sistema imune (Tabibzadeh e col., 1989). Kameda e col. (1990), utilizando técnicas de imunocitoquímica, verificaram a presença de IL-6 no trofoblasto mas o significado biológico da presença de IL-6 na placenta não está ainda determinado. De facto, pouco se sabe sobre as fontes, regulação e papel da IL-6 nos tecidos gestacionais. Esta citocina é produzida por células decíduais humanas em cultura e a sua síntese é regulada por citocinas ligadas aos processos inflamatórios como a IL-1 α , a IL-1 β e o TNF (Dudley e col., 1992). Estes autores demonstraram ainda que a IL-6 estimula a síntese de prostaglandina PGE₂ pelas células decíduais. A IL-6 potencia ainda os efeitos de outras citocinas como o GM-CSF. As células decíduais humanas produzem GM-CSF em resposta a mitógenos e leucócitos paternos e este factor favorece a implantação e o crescimento placentário (Stallmach e col., 1995b). A IL-6 secretada pela decidua poderá actuar em sinergia com outros factores de crescimento produzidos na interface materno-fetal de modo a assegurar a sobrevivência fetal e o normal desenvolvimento da gravidez por estimulação da proliferação e da diferenciação do trofoblasto (Dudley e col., 1992).

6.2. Os factores de crescimento tipo insulina

Os factores de crescimento tipo insulina ("insulin-like growth factors"-IGFs I e II) são peptídeos de baixo peso molecular (7 kDa), que apresentam homologia estrutural com a insulina. São factores de crescimento que estão envolvidos em importantes funções biológicas como o crescimento embrionário, a divisão e a diferenciação celular e o metabolismo das proteínas e hidratos de carbono. Os IGFs são produzidos por vários tecidos e existem também em circulação, sendo o fígado a principal fonte dos IGFs circulantes. Os IGFs têm, assim, a capacidade de exercer acções endócrinas ou actuarem localmente nos tecidos de forma autócrina e/ou parácrina (revisão em Cohick e Clemmons, 1993). Os IGFs ligam-se a receptores existentes nas membranas celulares, receptores designados como tipo I e tipo II. O IGF-I e o IGF-II exercem os seus efeitos a nível celular após interacção com o receptor tipo I, enquanto que o receptor tipo II parece estar envolvido na eliminação do IGF-II.

As IGFBPs ("insulin-like growth factors binding proteins") são proteínas que ligam os IGFs, com grande afinidade, quer nos tecidos quer em circulação, e que podem regular quer positivamente quer negativamente a acção desses factores (Clemmons, 1991). No Rato e no Homem foram identificadas seis IGFBPs designadas por números de 1 a 6. A primeira IGFBP a ser caracterizada foi a IGFBP-1 humana, purificada do líquido amniótico e decidua, a principal proteína secretada pelo endométrio na fase secretora e pela decidua durante a gravidez (Koistinen e col., 1986).

O sucesso do início da gravidez resulta de uma sincronia dos processos de crescimento e diferenciação que ocorrem no útero e no embrião durante a implantação. Estes processos são coordenados pelas hormonas esteróides do ovário, mas o modo como o estrogénio e a progesterona actuam a nível molecular não está ainda esclarecido, embora se pense que as acções destas hormonas serão mediadas pelos efeitos autócrinos/parácrinos de factores de crescimento. De facto, as hormonas esteróides não conseguem por si só induzir a proliferação de células do útero *in vitro* e, por outro lado, o IGF-I por si só também não induz essa proliferação e só apresenta efeitos mitogénicos em combinação com o estrogénio (Ghahary e col., 1990). O IGF-I poderá, assim, ter uma função autócrina /parácrina no início da gravidez.

Vários estudos demonstraram que o estrogénio regula a síntese do IGF-I no útero (Murphy e col., 1987a; Murphy e col., 1987b; Norstedt e col. 1989). O tratamento com estrogénios provoca um aumento da expressão do mRNA codificante para o IGF-I nas células do epitélio, estroma e miométrio. Para além do IGF-I, a síntese do IGF-II também é induzida pelo estrogénio (Murphy e col. 1987a), embora Norstedt e col. (1989) não verificassem essa indução. A regulação da expressão dos receptores para os IGFs no útero parece ser mediada de modo semelhante pelo estrogénio (Yallampalli e col., 1993; Ghahary e Murphy, 1989), enquanto que esta hormona induz um decréscimo da actividade das IGFBPs. Do equilíbrio desta regulação IGFs/IGFBPs resulta a biodisponibilidade e a actividade funcional dos IGFs.

Durante o ciclo menstrual e início da gravidez o endométrio sofre mudanças características em resposta aos esteróides circulantes, ocorrendo uma intensa actividade mitótica e de remodelação de tecidos. Os IGFs estão envolvidos nestes processos de mitose e diferenciação actuando como mediadores das hormonas esteróides. Giudice e col. (1993) estudaram a expressão dos IGFs no endométrio durante o ciclo menstrual e no início da gravidez e verificaram que o IGF-I era intensamente expresso no endométrio na fase proliferativa e no início da fase secretora. A expressão para o IGF-II era diferente, mais intensa na fase secretora tardia (endométrio já decidualizado) e na decidua no início da gravidez, sugerindo uma acção mitogénica para o IGF-I e para o IGF-II um papel importante na diferenciação que ocorre no processo de decidualização. No entanto, Han e col. (1996) não encontraram expressão para o IGF-II na decidua e sugeriram que a expressão encontrada por Giudice e col. (1993) era resultado de uma contaminação da decidua com trofoblasto (que sintetiza IGF-II).

A acção dos IGFs no endométrio é modulada pelas IGFBPs e pela produção dos receptores para os IGFs. De facto, a maior expressão dos receptores para os IGFs verifica-se na fase secretora e no início da gravidez (Giudice e col., 1993). As IGFBPs têm uma expressão diferente durante o ciclo e gravidez e actuam localmente como inibidores ou potenciadores das acções dos IGFs (Giudice e col., 1991).

Os IGFs, os seus receptores e as IGFBPs também existem no útero do Rato onde exercem funções importantes a nível do crescimento embrionário e uterino. Vários autores realizaram estudos de localização destes factores no deciduoma, durante o ciclo

estral e no início da gravidez. Croze e col. (1990) estudaram a expressão dos mRNAs codificantes para o IGF-I e para a IGFBP-1 no decíduoma. A maior intensidade de expressão para o IGF-I estava localizada no estroma e no miométrio enquanto que a IGFBP-1 se localizava essencialmente no epitélio luminal e nas glândulas do estroma, mas não nas células deciduais. À medida que a decidualização progredia, a expressão do IGF-I ia diminuindo e a expressão para a IGFBP-1 decaía depois do 6º dia. Sadek e col. (1994) descreveram para a IGFBP-1 uma localização semelhante, ou seja no epitélio luminal e glandular. Assim, ao contrário do que acontece na espécie humana, a localização da IGFBP-1 no rato parece ser glandular e não decidual. Ghahary e col. (1990) demonstraram a expressão do mRNA codificante para o IGF-I durante o ciclo estral em todos os tecidos uterinos, mas com especial intensidade de sinal no miométrio. Outros autores estudaram a expressão do IGF-I durante a gravidez, mas todos os estudos foram realizados essencialmente no período de peri-implantação e estádios muito iniciais de gravidez. Assim, Kapur e col. (1992) demonstraram no ratinho a co-expressão dos mRNAs codificantes para o IGF-I e para o seu receptor no útero no período de peri-implantação. Estes autores sugeriram para o IGF-I uma acção autócrina/parácrina e propuseram ainda que o IGF-I produzido no útero poderia exercer efeitos parácrinos sobre o embrião via receptores para o IGF-I. De facto, no embrião foram descritos receptores para o IGF-I e Smith e col. (1993) para além de demonstrarem a sua presença verificaram que o IGF-I internalizado por endocitose era de origem materna. O IGF-I parece assim, exercer um papel na interface materno-fetal.

Diversas patologias na gravidez têm vindo a ser associadas a alterações das concentrações dos IGFs/IGFBPs locais e circulantes. Os mecanismos envolvidos nessas patologias são actualmente objecto de estudo quer na mulher, quer nos roedores como modelos que auxiliam o estudo das fases iniciais de gravidez. Em relação ao IGF-I, o nível sérico materno deste factor aumenta durante a gravidez e está correlacionado positivamente com o peso à nascença (Caufriez e col., 1994). Em casos de pré-eclampsia há uma diminuição dos níveis séricos maternos de IGF-I. Em casos de atraso de crescimento intrauterino Holmes e col. (1997) encontraram baixos níveis de IGF-I e altos níveis de IGFBP-1 na circulação materna. A análise do sangue do cordão umbilical nos casos de atraso de crescimento intrauterino revelou baixos níveis de IGF-I em relação a

bébés normais (Spencer e col., 1995; Leger e col., 1996; Ostlund e col., 1997), enquanto que se verificavam níveis mais elevados no caso de diabetes (Liu e col., 1996). Assim, os níveis de IGF-I parecem ser determinantes no crescimento embrionário e peso e tamanho à nascença. No entanto, uma prova directa do papel do IGF-I no crescimento fetal só existe, até à data, nos animais. Ratinhos homozigóticos para alelos disfuncionais do IGF-I e receptor tipo I exibem um profundo atraso de crescimento embrionário, fetal e pós-natal (Liu e col., 1993; Baker e col., 1993).

O papel do IGF-II no desenvolvimento embrionário humano não está totalmente esclarecido embora, nos roedores, seja essencial para um crescimento intrauterino normal (Baker e col., 1993). O estudo da expressão do IGF-II, durante a gravidez nos mamíferos, tem vindo a revelar-se complexo mas muito interessante pela sua relação com atrasos de crescimento intrauterino e macrossomia fetal, demonstrada em trabalhos realizados em ratinhos. Estes estudos evidenciaram o IGF-II como um regulador directo do crescimento intrauterino. Ratinhos com modificações no gene codificante para o IGF-II mostraram a presença de fetos com peso inferior ao normal, o que acontecia sobretudo na segunda metade da gravidez, altura em que a placenta tem um papel determinante para o crescimento fetal (DeChiara e col., 1990). No entanto, não ficou claro se a diminuição de peso era devida à diminuição do IGF-II no feto, na placenta ou em ambos. Em estudos posteriores, Forejt e Gregorova (1992) verificaram em ratinhos deficientes para a expressão do receptor tipo II que os recém-nascidos tinham um peso superior ao normal. Estes resultados sugerem que o IGF-II induz crescimento e diferenciação primariamente através da ligação ao receptor tipo I, actuando o receptor tipo II sobretudo como um inibidor da função do IGF-II (Czech, 1989).

Na espécie humana, a relação IGF-II versus alterações de peso fetal não é tão evidente como no ratinho. Uma das principais evidências é fornecida pelo síndrome de Beckwith-Weidemann. Este síndrome está associado a altos níveis de IGF-II traduzindo-se num tamanho exagerado das placentas e dos bebés quando comparados com processos normais. Alguns fetos com este síndrome apresentam uma hipertrofia dos tecidos mesenquimatosos da placenta, o que poderia ser secundário a uma expressão exagerada de IGF-II nas vilosidades coriônicas fetais.

Na tentativa de esclarecer a origem do IGF-II determinante para o crescimento fetal, Redline e col. (1993) estudaram a expressão do IGF-II na placenta de ratinho e verificaram que o trofoblasto mostrava uma expressão dinâmica ao longo do tempo que reflectia a constante diferenciação das populações trofoblásticas durante a gravidez. No rato, Zhou e Bondy (1992) analisaram o padrão de expressão dos IGFs, dos seus receptores e das IGFBPs na placenta. A expressão sugeria uma interrelação entre o IGF-II, os seus receptores e a IGFBP-2 no desenvolvimento da placenta. A expressão do IGF-II era intensa nos tecidos trofoblásticos contribuindo para a formação da placenta desde a implantação. Ainda no rato, Cerro e Pintar (1997) estudaram a localização das IGFBPs no útero e encontraram expressão em todos os tecidos sugerindo múltiplos papéis para estas proteínas na regulação da extensão da decidualização e no crescimento do miométrio.

Recentemente, Han e col. (1996) estudaram a expressão dos IGFs e suas IGFBPs na placenta humana. Na placenta do primeiro trimestre, o mRNA codificante para o IGF-I não era detectado nos tecidos fetais mas sim no estroma do endométrio, enquanto que, o IGF-II não era detectado nos tecidos maternos, mas sim, nas colunas de citotrofoblastos que invadiam o endométrio, sugerindo uma acção no processo invasivo. Por outro lado, a sua expressão era também detectada no mesenquima das vilosidades, o que pode indicar o seu envolvimento em processos de proliferação e diferenciação de citotrofoblastos em sinciotrofoblastos. Em relação às IGFBPs, todas (1-6) eram expressas pela decidua. O mRNA codificante para a IGFBP-1 era largamente predominante no tecido decidual, sugerindo que esta proteína poderia interactuar com os IGFs de origem fetal.

O possível elo de ligação entre o atraso do crescimento fetal e o metabolismo dos IGFs é de considerável importância clínica. Seria de grande interesse determinar se através de medidas terapêuticas se poderiam normalizar as altas ou baixas concentrações de IGFs e IGFBPs no soro e assim influenciar o crescimento fetal. Recentemente, a administração exógena de IGF-I como medida terapêutica em casos de atraso de crescimento intrauterino tem vindo a ser estudada em animais. Tarantal e col. (1997) administraram intraperitonealmente IGF-I a fetos de macacas rhesus (*Macaca mulatta*) e verificaram que esse tratamento provocava um aumento das concentrações circulantes de IGF-I fetais e um aumento significativo de peso dos órgãos hematopoiéticos e tecidos linfóides nomeadamente do timo, baço e intestino delgado.

Estes dados, acompanhados dos resultados de Schoknecht e col. (1997) que verificaram que a administração de IGF-I a suínos com baixo peso à nascença restabelecia os índices de crescimento para níveis normais, sugere que o IGF-I poderá ser um potencial agente terapêutico em casos de atraso de crescimento intrauterino.

7. Síntese de proteínas no início da gravidez no Homem e no Rato

A diferenciação das células do estroma do endométrio em células decíduais está associada com a alteração da síntese e secreção de vários produtos, todos potencialmente capazes de afectar o ambiente uterino e tecidos da unidade fetoplacentária. Esses produtos, se produzidos em níveis suficientes para serem detectados na circulação periférica, poderão ter um potencial valor clínico contribuindo para a detecção de disfunções da implantação e disfunções do endométrio. Vários investigadores dedicaram-se ao estudo das proteínas sintetizadas pela decidua de diferentes espécies numa tentativa de esclarecer qual a possível função desse tecido.

7.1. Homem

Vários autores demonstraram a síntese de proteínas no endométrio da fase secretora tardia e no tecido decidual no início da gravidez (O'Grady e col, 1977; Joshi e col. 1980a,b; Stuclyffe e col.,1980). As primeiras proteínas identificadas foram a proteína α -uterina (AUP-" α -uterine protein") e a proteína endometrial dependente da progesterona (PEP-"progestogen-dependent endometrial protein"). No entanto dada a sua identidade imunológica foram consideradas proteínas idênticas (Stuclyffe e col.1982). Bell e col. (1985), por incubação *in vitro* de fragmentos de endométrio do início da gravidez, detectaram a presença de 17 proteínas do endométrio ("Endometrial Proteins"-EP) secretadas para o meio de incubação. Destas, destacam-se a EP 14, também denominada α 1-PEG ("pregnancy endometrial glycoprotein"), proteína placentária-PP12 e IGFBP-1 e a EP 15 também denominada α 2-PEG, PEP, AUP e PP14. A síntese destas proteínas

variava com o período de gravidez a que se reportavam as amostras de endométrio. O exame histológico permitiu estabelecer uma correlação entre o tipo de proteína secretada e a morfologia da amostra. Assim, a EP 15 era sintetizada pelo epitélio glandular no início da gravidez, enquanto que a EP 14 estava associada com o endométrio decidualizado. A origem glandular da EP 15 é apoiada pelo facto de, no ciclo menstrual, ser a principal proteína produzida pelo endométrio na fase secretora. A associação da EP 14 com tecidos totalmente decidualizados e com amostras obtidas em estádios mais tardios do 1º trimestre sugerem a sua produção pelo tecido decidual. Deste modo, parece existir uma troca entre a EP 15 e a EP 14 no início da gravidez, o que provavelmente representa a diferenciação do endométrio de tipo secretor para decidualizado. Rutanen e col. (1984) detectaram a proteína placentária-PP12 na membrana sinciciotrofoblástica da placenta, no epitélio secretor do endométrio e na decidua, tendo-se verificado, posteriormente, que se tratava da EP 14.

7.1.1. Proteína placentária-14 (PP14)

A PP14 é a principal proteína secretada durante a segunda metade da fase luteal do ciclo e no início do 1º trimestre. É uma glicoproteína dimérica que apresenta polimorfismos e variações no peso molecular de acordo com a sua origem (peso molecular médio 28 kDa por sub-unidade, pl 4,6). Foi sugerido que esta proteína seria secretada desde o lúmen das glândulas até ao lúmen uterino. A sua localização imunohistológica nas secreções das glândulas, a sua recuperação no lúmen uterino e a sua presença no líquido amniótico (Joshi e col. 1980b) parecem apoiar essa hipótese. O seu pico de produção ocorre na 6ª semana e decresce rapidamente para níveis muito baixos na 15ª semana. No soro materno aparece um pico de produção da 7ª à 9ª semana, ao qual se segue um decréscimo. A principal origem da PP14 no início da gravidez, parece ser o epitélio glandular secretor da decidua esponjosa. Este tecido tem o seu máximo desenvolvimento durante o 1º trimestre e depois involui na restante fase da gravidez. Assim, a sua síntese, secreção e concentrações séricas são explicáveis segundo o desenvolvimento e regressão do epitélio glandular. Têm sido propostas para esta proteína

funções imunossupressoras. A PP 14 foi considerada como sendo a proteína responsável, em extractos citosólicos de endométrio no 1º trimestre, pela inibição da "mixed lymphocyte reaction" e da proliferação de linfócitos induzida por mitogénios (Bolton e col., 1987; Pockley e Bolton, 1990).

7.1.2. Proteína placentária-12 (PP12), IGFBP-1

A IGFBP-1 é produzida no fígado, útero e diversos tecidos fetais. Na mulher grávida o local predominante de síntese são as células do estroma do endométrio decidualizado. A IGFBP-1 foi inicialmente isolada do tecido decidual e líquido amniótico. Bell e col, (1985) e Rutanen e col. (1984) demonstraram que esta proteína era secretada durante o ciclo menstrual e gravidez. Na gravidez estava localizada nas células deciduais da decidua compacta (Bell e col., 1985), aumentando a sua síntese e secreção durante o 1º trimestre. Este facto sugeriu o seu relacionamento com o aumento da decidualização do endométrio. Deste modo, este autor definiu a α 1-PEG como o principal produto da célula decidual na gravidez. A sua presença foi também detectada no líquido amniótico, possivelmente derivada da decidua, e no soro (Bell, 1986).

A PP 12 foi identificada por Bell e col. (1988) como uma proteína que liga o factor de crescimento IGF-I ("insulin-like growth factor binding protein"-IGFBP-1), inibindo não só a ligação do IGF-I ao seu receptor, como também a sua actividade biológica, quer no endométrio não grávido quer em culturas de coriocarcinoma (Rutanen e col., 1988; Ritvos e col., 1988). O seu nível sérico em mulheres não grávidas, é de 9-47 μ g/l. Durante a gravidez os valores começam a aumentar por volta da 8ª semana aparecendo depois dois picos, o primeiro às 18-24 semanas (valor médio 90-120 μ g/l) e o segundo às 36-40 semanas (70-90 μ g/l) mantendo-se a sua síntese até ao parto. As concentrações da IGFBP-1 na circulação materna derivam essencialmente da decidua. Ao nascimento, a concentração no sangue do cordão umbilical é da mesma ordem que no sangue materno, enquanto que no líquido amniótico os valores são de 100 a 1000 vezes mais elevados (média de 30 mg/l às 16 semanas e de 15 mg/l ao nascimento). A IGFBP-1

presente no líquido amniótico é provavelmente derivada da decidua, podendo, assim, ser considerada um marcador decidual no líquido amniótico e soro.

Pouco se sabe sobre a regulação e sobre o significado biológico da IGFBP-1 na gravidez. A progesterona e a relaxina estimulam a sua produção pelas células deciduais, enquanto os IGFs parecem ter um efeito contrário (Bell e col., 1991; Thraikill e col., 1990). Uma das suas funções será a regulação dos IGFs, inibindo ou potenciando as suas acções mitogénicas e a capacidade invasora do trofoblasto (Rutanen e col., 1988; Jones e col., 1993). Recentemente, Irwin e Giudice (1997) utilizando um sistema de co-cultura de células deciduais e células do citotrofoblasto demonstraram que a IGFBP-1 limita a invasão do trofoblasto. Outros autores, pelo contrário, atribuíram-lhe funções estimuladoras da migração do citotrofoblasto *in vitro* (Jones e col., 1993). Esta discrepância de resultados poderá ser devida aos diferentes sistemas de cultura utilizados e ao facto de Irwin e Giudice (1997) terem utilizado células recentemente isoladas, que poderão responder aos sistemas de regulação de modo diferente das células em cultura prolongada, utilizadas por Jones e col. (1993). Sabe-se que a invasão dos tecidos maternos pelo trofoblasto deve ser equilibrada e controlada já que uma normal placentação é essencial para um normal desenvolvimento fetal. A decidua materna parece exercer um papel importante na regulação da invasão do trofoblasto e a IGFBP-1 presente na interface materno-fetal poderá ser um regulador parácrino dessa invasão.

A IGFBP-1 como proteína presente na interface materno-fetal deverá sofrer alterações da sua concentração em circulação, reflectindo eventuais patologias existentes durante a gravidez. Na pré-eclampsia a migração das células trofoblásticas nas paredes das artérias espiraladas uterinas é deficiente, não se sabendo se resulta de um defeito intrínseco da actividade invasiva do trofoblasto ou da intolerância materna ao feto. Groot e col. (1996) colocaram a hipótese de que a reduzida invasão do trofoblasto, que se verifica em casos de pré-eclampsia, afectava a secreção para a circulação materna de proteínas deciduais. Para explicar esta hipótese tentaram encontrar um marcador bioquímico da invasão trofoblástica que reflectisse essa reduzida invasão. Para isso, realizaram um estudo prospectivo das concentrações plasmáticas de IGFBP-1 durante a gravidez e concluíram que as mulheres cuja gravidez resultou em pré-eclampsia, apresentavam níveis plasmáticos de IGFBP-1 muito inferiores aos da gravidez normal. No

entanto, outros autores referiram um aumento da concentração sérica de IGFBP-1 e uma diminuição dos níveis de IGF-I (Howell e col., 1989; Giudice e col., 1997). Esta disparidade de resultados poderá dever-se a diferentes metodologias de análise e gravidade da pré-eclampsia. Verhaghe e col. (1993) demonstraram que a concentração sérica de IGFBP-1 no cordão umbilical está inversamente correlacionada com o peso fetal à nascença e um aumento da concentração de IGFBP-1 no sangue fetal foi encontrado em casos de atraso de crescimento intrauterino (Ostlund e col., 1997). No entanto, Spencer e col. (1995) não encontraram diferenças nos níveis de IGFBP-1 em casos de atraso de crescimento intrauterino, mas sim menores níveis de IGF-I.

Na gravidez normal os níveis de IGF-I aumentam progressivamente durante a gestação, enquanto que os níveis de IGFBP-1 não apresentam grandes diferenças entre o 2º e o 3º trimestres. Assim, os níveis dos IGFs durante a gravidez poderão ser regulados por outras IGFBPs para além da IGFBP-1. De facto, a IGFBP-3 sofre proteólise durante a gravidez que resulta numa libertação do IGF-I ligado e num consequente aumento do IGF-I livre (Giudice e col., 1990). A IGFBP-3 parece também estar envolvida na regulação do crescimento fetal embora o seu papel ainda não esteja esclarecido. Barrios e col. (1996) encontraram baixos níveis no sangue fetal de prematuros enquanto Leger e col. (1996) não encontraram diferenças nos casos de atraso de crescimento intrauterino quando comparados com bebés normais.

A importância de um ambiente uterino favorável ao bom desenvolvimento fetal tem vindo a ser realçada nos últimos tempos. Sabe-se, que o ambiente uterino tem desde muito cedo influência no crescimento da placenta e um deficiente crescimento fetal está associado a um aumento dos riscos de doenças no adulto como hipertensão e diabetes (Barker e col., 1989). Wheeler e col. (1995) estudaram uma possível relação entre o ambiente uterino e as concentrações em circulação da IGFBP-1 e da PP14 e verificaram que a concentração de IGFBP-1 estava negativamente correlacionada com o peso materno enquanto a PP14 não apresentava qualquer correlação. A PP14 apresentava uma correlação negativa com as concentrações séricas de hemoglobina e ferritina maternas. Nas mães fumadoras, as concentrações de PP14 apresentavam-se significativamente diminuídas, mas as de IGFBP-1 não estavam alteradas. A concentração de IGFBP-1 estava positivamente correlacionada com as concentrações maternas de gonadotrofina coriónica

e lactogénio placentário enquanto que a PP 14 se correlacionava positivamente com a primeira mas não com a última. Estes resultados demonstram que existe uma influência do ambiente materno na função do endométrio e placenta. Eventualmente a conclusão mais importante, proposta por estes autores, será a correlação negativa entre a concentração de IGFBP-1 e o peso materno. Assim, o peso da mulher poderá determinar a concentração de IGFBP-1 desde a concepção. As concentrações de IGFBP-1 no endométrio poderão influenciar as interações entre as células trofoblásticas e a decidua materna. As diferenças na produção desta proteína, reflectindo o peso materno, poderão proporcionar um importante mecanismo pelo qual o ambiente uterino influencia o crescimento fetal. No entanto, alguma precaução deverá existir na interpretação do significado da determinação da IGFBP-1 em circulação, uma vez que a concentração de IGFBP-1 no plasma materno tem origem decidual, mas, é possível que a produção desta proteína pelo fígado materno esteja também aumentada durante a gravidez. Para além disso, as concentrações plasmáticas poderão não reflectir as concentrações tecidulares locais. As diferenças na produção desta proteína e a sua relação com o peso materno poderão sugerir um importante mecanismo através do qual o ambiente materno poderá influenciar o crescimento placentário e fetal e proporcionar um campo de estudo de grande aplicação clínica.

Tal como na espécie humana, a IGFBP-1 é quantitativamente a principal proteína secretada pela decidua durante a gestação no babuíno (Fazleabas e col., 1989), o que pode indicar conservação de síntese nas espécies.

7.2. Rato

A transformação dos fibroblastos do estroma em células deciduais, nas espécies em que ocorre a decidualização, levanta questões importantes quanto ao processo de diferenciação celular. Estes fibroblastos possuem características únicas, visto que são capazes de sofrer alterações de morfologia acompanhadas de alterações metabólicas, com produção de novas proteínas (Denari e col. 1976; Bell e col., 1985; Jayatilak e col. 1989).

Sabe-se que o teor de proteínas totais aumenta durante a decidualização quer esta seja provocada pelo blastocisto quer por estímulos artificiais. Reid e Heald (1970) verificaram, medindo a incorporação de aminoácidos marcados radioactivamente, um aumento da síntese proteica na manhã do 5º dia que corresponde à implantação e ao início da reacção decidual. Após a implantação, a síntese de proteínas permanecia elevada nos tecidos em decidualização mas não nas áreas por decidualizar. Mais tarde, Denari e col., (1976) observaram que 1h depois da aplicação de um estímulo traumático, ocorria o aparecimento de uma proteína, que denominaram Proteína A. Bell e col. (1976) indentificaram no 6º dia de gravidez uma proteína similar, a Proteína Induzida (IP- "induced protein") cuja síntese julgaram ser induzida pelo estradiol. Posteriormente, Bell e col. (1980) demonstraram que a síntese de IP estava elevada em decíduomas, mesmo quando não se observavam aumentos dos níveis de estradiol, sugerindo que a IP estaria envolvida na divisão celular durante a decidualização e que não seria uma proteína decidual específica ou dependente do estradiol, como foi inicialmente proposto.

Os primeiros estudos de extractos solúveis de tecido decidual de rato analisados por electroforese em SDS-PAGE demonstraram a presença de duas fracções, uma de peso molecular de 49 kDa, que aparecia associada ao tecido decidual, e outra de 100 kDa que era também detectável em extractos de úteros que não sofreram decidualização (Umapathysivam e Jones, 1978). Posteriormente, Bell (1979a; 1979b) demonstrou em extractos de tecido decidual a existência de duas proteínas de peso molecular aproximadamente de 40-42 kDa e 140-145 kDa. Verificou, ainda, que o endométrio decidualizado e a glândula metrial sintetizavam *in vitro* uma proteína de alto peso molecular a que chamou de proteína associada à decidualização (DAP- "decidualization-associated protein") (ver ponto 8.).

No tecido decidual do rato, a zona da decidua do antimesométrio e a do mesométrio para além de apresentarem diferentes morfologias têm também produtos de secreção diferentes, que sofrem variações com o tempo. Como já referido, o desenvolvimento das duas zonas deciduais ocorre sequencialmente, formando-se as células da decidua do mesométrio dois dias depois das do antimesométrio e tornando-se diferenciadas já quando as do antimesométrio estão em regressão. Jayatilak e col. (1989) estudaram a secreção de proteínas em explantes de decíduoma e verificaram grandes

diferenças espaciais e temporais na secreção proteica do antimesométrio e do mesométrio. A secreção de várias proteínas no antimesométrio (~90 kDa, 42 kDa, e 28 kDa) diminuía com o tempo, sendo a proteína de 28 kDa secretada em grandes quantidades. Uma proteína de 180 kDa era a principal proteína secretada pela decidua do mesométrio, enquanto que a de 28 kDa era sintetizada em quantidades vestigiais. Consideraram, assim, como principal produto de secreção da decidua do mesométrio a proteína de 180 kDa, correspondente à DAP, enquanto que no antimesométrio, a proteína de 28 kDa (o factor luteotrópico) foi considerada como um marcador da decidualização no antimesométrio. Estes resultados confirmaram as observações de Gibori et col. (1974) que demonstraram que as células deciduais do antimesométrio produziam o factor luteotrópico (28 kDa). Esta molécula parecia controlar a função luteal no ovário, estando a sua síntese abruptamente reduzida a partir do 12º dia, dia em que a decidua do antimesométrio já está em regressão. Assim, esta hormona é considerada como sendo do tipo da prolactina e devido à sua acção directa no corpo lúteo do rato foi chamada de factor luteotrópico ou luteotropina decidual.

8. A proteína associada à decidualização-DAP

Bell (1979a) verificou em extractos de deciduoma que o endométrio decidualizado sintetizava *in vitro* uma proteína de alto peso molecular a que chamou de proteína associada à decidualização ("decidualization-associated protein"-DAP), o que não acontecia no útero não estimulado. Este autor (1979b) usando extractos de tecidos uterinos e utilizando a técnica de electroforese em SDS-PAGE, verificou que a síntese de DAP também ocorria no útero durante a gravidez. Porém, esta síntese não se verificava nem nos locais extra-implantação, nem no 5º, 6º e 7º dias de gravidez. No endométrio, a síntese da DAP iniciava-se no 8º dia e aumentava até ao 12º dia, decrescendo ligeiramente a partir do 14º dia. Quando era realizada uma separação dos tecidos do antimesométrio e do mesométrio a síntese estava restrita a este último. O desenvolvimento da decidua neste pólo reflecte o padrão de síntese de DAP, isto é, o aparecimento da síntese ao 8º dia e atingindo um máximo entre o 11º e 13º dias correspondendo a um máximo de

desenvolvimento da decidua (DeFeo, 1967). Bell (1979c), utilizando a técnica de imunoelectroforese, estudou a distribuição da DAP no soro materno ao longo da gravidez e demonstrou uma distribuição bifásica. O primeiro dia em que a DAP era detectada no soro era o 9º dia de gravidez, seguido de um aumento até cerca do 14º dia. Posteriormente, havia um pequeno decréscimo e um segundo pico perto do final da gravidez e início do pós-parto (Fig. 4). Este padrão sérico da síntese da DAP era concordante com a distribuição da DAP *in vivo*. No entanto, essa distribuição *in vivo*, não explicava o segundo pico que se observava no final da gravidez. Este poderia ser devido à síntese da α 2-macroglobulina (α 2M), também chamada de alfamacrofetoproteína (AMF), pelo fígado fetal (Gitlin e Boesman, 1967; Sarcione e Bohne, 1969). A AMF é uma proteína imunologicamente idêntica à DAP (Bell 1979c), apresentando reactividade cruzada com o anti-soro anti-DAP. No rato, a AMF é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado adulto em resposta a uma inflamação e pelo fígado fetal durante a gravidez e pós-parto (Sarcione e Bohne, 1969; Bell 1979c).

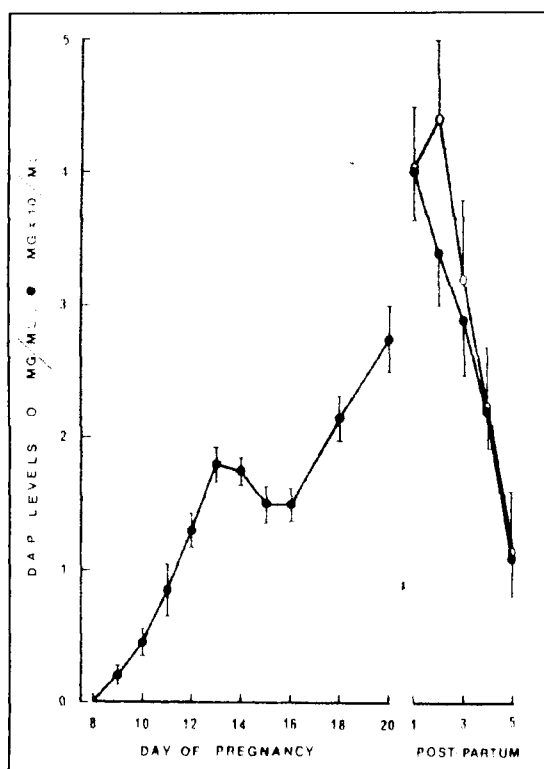


Figura 4 - Níveis de DAP no soro materno durante a gravidez e no soro materno e neonatal ao nascimento e pós-parto obtidos por imunoelectroforese com um anti-soro anti-DAP. Os valores correspondem à média de sete determinações em diferentes animais (retirado de Bell, 1979).

Teixeira e O' Grady (1992) confirmaram a síntese da DAP pelas células deciduais e realizaram um estudo comparativo das propriedades físico-químicas da DAP e AMF. Os pesos moleculares da DAP e AMF foram determinados por PAGE como sendo semelhantes e de cerca de 820 kDa. No entanto, este resultado foi obtido por extrapolação já que em PAGE a proteína de maior peso molecular utilizada como padrão foi a $\alpha 2M$ humana com peso molecular de 725 kDa. A composição em aminoácidos destas proteínas foi determinada por hidrólise ácida apresentando a DAP uma maior concentração de prolina, enquanto que a AMF exibia maior teor em lisina. No entanto, estes resultados não são concordantes com os de outros investigadores (Gauthier e Mouray, 1976; Gordon 1976; Nieuwenhuisen e col., 1979). A composição em carboidratos foi determinada como sendo de 10% para a DAP e 7,6% para a AMF.

Teixeira (1986) a partir de homogeneizados de decidua estabeleceu um protocolo de purificação que permitiu a separação de duas formas de DAP com diferentes pls. A forma de DAP que existia em maior quantidade apresentava um pl de 5,2 enquanto que, a outra forma tinha um pl de 4,97. Esta última foi considerada como sendo a forma extracelular uma vez que aparecia na circulação materna. As diferenças existentes entre os pls das duas formas de DAP e o pl da AMF permitiu determinar a distribuição relativa da DAP e AMF nos tecidos durante a resposta de fase aguda e nos tecidos maternos e fetais durante a gravidez e pós-parto. Assim, estes processos de purificação foram aplicados a amostras de soros de fase-aguda, soros maternos do 12º ao 20º dia de gravidez, soro de 1 dia pós-pártum, amostras de fígado materno dos mesmos dias de gravidez, de fase aguda e fetal (20º dia) e de tecido decidual (12º dia). Teixeira (1986) demonstrou que no estado inflamatório o soro e o fígado só continham proteínas do tipo-AMF. A presença de AMF no fígado confirmava este órgão como a fonte desta proteína. No 12º dia de gravidez, a decidua continha só proteínas do tipo-DAP. Não foi encontrado nenhum destes tipos de proteínas no fígado materno, e apesar da presença de grandes concentrações de DAP na decidua só foram encontrados vestígios de DAP com pl 4,97 na circulação materna. Outros investigadores demonstraram a presença de AMF no soro materno no 12º dia (Bell 1979c; Panrucker e col., 1983), resultado que poderá ser devido às semelhanças estruturais e identidade imunológica entre a AMF e a DAP. No 20º dia de gravidez o fígado fetal continha somente proteínas tipo-AMF, o que confirma a síntese de

AMF pelo fígado fetal, como já tinha sido demonstrado por Sarcione e Bohne (1969). Neste dia, na circulação materna, foram observadas quantidades vestigiais da forma secretada da DAP existindo, no entanto, predomínio da AMF.

A AMF é um inibidor de proteases com um papel importante na inflamação e reorganização tecidual (Barrett e Starkey, 1973) podendo também induzir imunossupressão (Petersen e col., 1989). Teixeira e col. (1991) demonstraram que a DAP isolada do tecido decidual no 12º dia de gravidez inibia as propriedades proteolíticas da tripsina e catepsina B em relação aos substratos de alto peso molecular, não interferindo contudo, na actividade sobre os de baixo peso molecular, o que é uma característica das α 2-macroglobulinas. Por outro lado, a DAP apresentava propriedades de imunossupressão com inibição da blastogénese em culturas de linfócitos do baço estimulados com concanavalina A (ConA). A DAP reduzia a resposta blastogénica em cerca de 60% (Teixeira e col., 1991). Estes investigadores demonstraram ainda, em ensaios *in vivo*, que a DAP inibia a síntese de IgMs específicas e induzia a secreção de imunoglobulinas não específicas sugerindo uma função no controlo imunológico das interacções materno-fetais (Teixeira e col., 1992).

9. A α 2-macroglobulina do rato como proteína de fase aguda (AMF)

A inflamação é uma reacção do organismo a uma agressão dos tecidos. A resposta de fase aguda a um processo inflamatório é uma reacção complexa e específica que está associada a fenómenos de leucocitose, febre, aumento de secreção de várias hormonas e é acompanhada pelo aumento e diminuição da síntese hepática de várias proteínas do plasma, conhecidas como "proteínas de fase aguda". Um método utilizado frequentemente para provocar uma resposta de fase aguda no rato, é a injeção subcutânea de terebentina (cerca de 0,5 ml/100 g peso, corporal). No estado inflamatório de fase aguda várias proteínas como a α 1-antitripsina, α 1-antiquimiotripsina e a α 2-macroglobulina apresentam-se em circulação em elevadas concentrações.

A α 2-macroglobulina do rato já teve nomenclatura diversa, tendo sido designada de "slow α 2 globulin", " α 2 glycoprotein", " α 2 acute phase globulin", "abnormal serum

globulin", "reproduction associated protein", " α_2 macroglobulin". Em 1970, a Organização mundial de Saúde recomendou o nome de alfa macrofetoproteína (AMF).

A AMF foi inicialmente detectada por Darcy (1955) no soro de ratos com tumores, não sendo detectada no soro de ratos saudáveis. Vários autores, utilizando técnicas de culturas de tecidos e técnicas de perfusão, demonstraram que o local de síntese da AMF em ratos adultos com um estado inflamatório induzido e em fetos e recém-nascidos era o fígado (Benjamin e Weimer, 1966; Sarcione e Bohne, 1969; Darcy, 1960; Heim, 1962; Van Gool e Ladiges, 1969). Durante a gestação, Panrucker e Lorscheider (1983) e Panrucker e col. (1983) descreveram uma distribuição bifásica da AMF no soro sugerindo que esta proteína teria uma distribuição e síntese diferente durante as várias fases do desenvolvimento. Estes autores demonstraram, usando culturas de tecidos, que durante a gravidez a síntese era predominante na glândula metrial, e em menor extensão nos leucócitos do sangue, no baço e no timo. Ainda de acordo com estes autores, estas fontes maternas de AMF seriam as responsáveis pelos altos níveis de AMF encontrados no soro materno. No final da gestação, o fígado fetal foi considerado como a principal fonte de AMF. De facto, os perfis de concentração de AMF no soro materno no início da gravidez (dias 8-12) e final da gravidez (dias 17-21) observados por Panrucker e col. (1983) são concordantes com os obtidos por Bell (1979c), embora este autor tenha considerado que os valores no soro no início da gestação possam ser causados pela proteína associada à decidualização (DAP) sintetizada pelo tecido decidual.

A AMF é uma proteína plasmática que no rato saudável existe em baixas concentrações, cerca de 10-100 $\mu\text{g/ml}$, mas que sofre um grande aumento durante a resposta de fase aguda (3-8 mg/ml). Assim, a indução de um estado inflamatório em ratos, provoca um aumento da concentração de AMF no soro, que se inicia cerca de 4 a 8 hs depois (Van Gool e Ladiges, 1969; Hudgig e Sell, 1978), aumentando significativamente nas 24-36 hs seguintes.

Os mecanismos responsáveis pelo aumento da síntese de AMF foram objecto de estudo de vários investigadores. Aparentemente a síntese de AMF aparecia associada à inflamação, regeneração e reparação dos tecidos. Weimer e col. (1967) observaram que o aumento da AMF coincidia com o aumento progressivo da massa tumoral do carcinoma Walker 256 e postularam que o aparecimento da AMF no sangue estava relacionado com

o trauma contínuo que o crescimento tumoral exercia sobre os tecidos. Posteriormente, Hudgig e col. (1979) confirmaram que o aumento de AMF em animais com carcinoma hepático era causado pela inflamação e necrose nos tecidos e não pela síntese de AMF pelas células do carcinoma. Northeman e col. (1983) estudaram a síntese de AMF no fígado de rato, após indução de um estado inflamatório, por injeção intramuscular de terebentina, e compararam em diferentes tempos, as concentrações de mRNA no fígado e da AMF no soro. Concluíram que o aumento da concentração de AMF no soro era dependente de um aumento hepático de mRNA. Por outro lado, um decréscimo no mRNA codificante para a AMF, que ocorria 21hs após indução, só provocava um decréscimo de AMF na circulação 60 hs depois. Em 1985, Northeman e col. confirmavam estes resultados iniciais medindo a transcrição *in vitro* do gene da AMF em núcleos isolados, verificando que a transcrição da AMF é induzida durante a inflamação.

9.1. Activadores da síntese de AMF

A produção da AMF *in vivo* tem início 4 hs após a indução do trauma (Van Gool e Ladiges, 1969; Hudgig e Sell, 1978) e aumenta rapidamente nas 24hs seguintes. Como durante os estados inflamatórios a concentração de glucocorticóides está elevada, vários autores investigaram a influência destes na estimulação da síntese de AMF. Heim e Ellenson (1965) usando lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella abortus*, como agente traumatizante em ratos adrenalectomizados, concluíram que a adrenalectomia causava a redução ou a abolição da produção da AMF. No caso de se administrar corticosterona a síntese de AMF era retomada pelo menos em parte. Na sequência destes trabalhos, outros autores mostraram que a adrenalectomia também inibia o aparecimento de AMF em ratos com hepatectomia parcial, com neoplasias (Heim e Ellenson, 1967) e no trauma tecidular que se segue à injeção de terebentina (Weimer e Benjamin, 1966; Weimer e Goggshall, 1967). Assim, parecia existir uma relação directa entre os glucocorticóides e a síntese de AMF, embora o mecanismo de indução da síntese não fosse conhecido. Foi também estudada a influência das citocinas envolvidas nos processos inflamatórios como a IL-1, o TNF- α e o INF- α na indução da síntese de proteínas de fase aguda em culturas de



hepatócitos. No entanto os resultados são divergentes e parecem resultar de diferenças nas concentrações de citocinas e nas condições de cultura utilizadas (Kushner e col., 1989). Mesmo assim, a IL-6 foi sempre apontada como a principal citocina indutora da síntese da $\alpha 2M$ *in vitro* e *in vivo*. Em culturas de hepatócitos, a administração de IL-6 levou a uma resposta dose-dependente na regulação da síntese de AMF (Castell e col., 1989) e a injeção de IL-6 levou à indução de uma resposta de fase aguda mais rápida na síntese de AMF que o mesmo estado causado por injeção de terebentina. Em culturas de hepatoma, Hattori e col. (1990) verificaram que a IL-6, por si só induz a transcrição do gene da $\alpha 2M$ e os glucocorticóides potenciam este efeito. Posteriormente, Horn e col. (1994) em culturas de hepatócitos referiram que a IL-6 induzia a síntese da $\alpha 2M$ necessitando da presença de glucocorticóides para a indução.

A síntese de AMF não é só corticosteróide-dependente, mas é também dependente do sexo. Bosanquet e col. (1976) observaram que enquanto a indução de inflamação em machos levava à produção de grandes concentrações de AMF, em fêmeas a resposta era consideravelmente menor. Para determinar se esta resposta era dependente das hormonas do ovário, Bell (1980) utilizou ratas ovariectomizadas, sujeitas a uma terapia de substituição com estradiol e progesterona, e concluiu que, de facto, existia dependência do sexo, já que a administração de estradiol ou de estradiol conjuntamente com progesterona resultava numa redução significativa da síntese de AMF.

9.2. Caracterização e propriedades físico-químicas da AMF

Em 1972, Jamieson e col. foram os primeiros autores a estudarem as características da AMF determinando o seu ponto isoeléctrico, peso molecular e conteúdo em hidratos de carbono. Desde então, vários autores estudaram esta proteína (Ganrot, 1973; Gordon, 1976; Gauthier e Mouray, 1976; Nieuwenhuizen e col., 1979; Okubo e col., 1981; Teixeira e O'Grady, 1992) e foram descritos pesos moleculares de 716 a 820 kDa e pontos isoeléctricos de 4,55 a 4,80. No entanto, a maior discrepância existente é nos valores encontrados para os carboidratos, que variam de 3,25 a 9,3% (tabela 1).

Tabela 1: Comparação das determinações físico-químicas da AMF segundo vários autores:

Autores	Peso molecular (KDa)	pI	Hexoses (%)
Jamieson e col.(1972)	800	4,6	9,3
Gordon (1976)	716	4,5	6,25
Gauthier e Mouray (1976)	770	4,5	4,25
Nienwenhuizen e col (1979)	760	4,8	3,85
Teixeira e O'Grady (1992)	820	4,8	7,6

Schauefele e Koo (1982) e Nelles e Schnebli (1982) compararam a estrutura da AMF com a α 1-macroglobulina (α 1M). A α 1M é uma proteína plasmática que existe normalmente no soro do rato e numa concentração muito superior à da AMF (3,76 mg/ml versus 0,016 mg/ml). A AMF só sofre um grande aumento durante uma inflamação aguda (Van Gool e col., 1977; Hudgig e Sell, 1978), enquanto que, neste caso, os níveis de α 1M se mantêm constantes. Embora a AMF e a α 1M sejam tetrâmeros com semelhanças no peso molecular, ponto isoeléctrico e composição de aminoácidos (Gordon, 1976; Gauthier e Mouray, 1976), apresentam diferenças nas suas sub-unidades (Schauefele e Koo, 1982). Em SDS-PAGE, a AMF, após redução, está dissociada numa sub-unidade de peso molecular de aproximadamente 180 kDa, enquanto que a α 1M apresenta duas sub-unidades de pesos moleculares aproximadamente 160 kDa e 40 kDa. Após tratamento com a tripsina a sub-unidade da AMF origina dois fragmentos de 85 kDa e 94 kDa, segundo Nelles e Schnebli (1982), de 88 e 77 kDa segundo Schauefele e Koo (1982) e três fragmentos de 90 kDa, 62 kDa e 29 kDa de acordo com Okubo e col. (1981). A AMF em meio alcalino (pH 11) e após aquecimento (37 °C durante 45 min), antes de ser reduzida, origina fragmentos de 125 kDa e 60 kDa, do mesmo modo que a α 2M humana. Por outro lado, a α 1M origina uma sub-unidade de 125 kDa e duas sub-unidades de 25 kDa (Nelles e Schnebli, 1982). Assim, enquanto que o tipo de clivagem da AMF é semelhante ao da α 2M humana (Harpel, 1973) o da α 1M é diferente. Além disso, ao contrário da α 1M que

não reage com soro de coelho anti-AMF (Gordon, 1976; Okubo e col., 1981) ou anti- α 2M humana (Heim, 1968), a AMF apresenta semelhanças antigénicas com a α 2M humana (Heim, 1968; Westrom e col., 1983). Estes resultados apontam para uma homologia estrutural da AMF com a α 2M humana.

Gehring e col. (1987) analisaram a sequência de cDNA da α 2M do rato e compararam-na com a sequência da α 2M humana. As duas sequências apresentavam uma grande homologia (73%), excepto na zona codificante para a "bait region", zona que contém as sequências de reconhecimento para as proteases que irão ser alvo de inibição. Esta grande homologia de sequências sugere uma conservação da estrutura tridimensional que é essencial para a sua função de molécula inibidora de proteases.

9.3. Mecanismo de acção e função da AMF

A AMF é um inibidor de proteases e pode controlar as proteases envolvidas na inflamação e na organização tecidual. Tal como outros inibidores de proteases que contêm a ligação tioéster (como a α 2M humana), a AMF inibe uma extensa variedade de proteases de diferentes classes e com diferentes especificidades (Barrett e Starkey, 1973). Em 1984, Okubo e col. determinaram a distribuição de [125 I] AMF em tecidos de ratos contendo lesões inflamatórias e sarcomas. A proteína marcada, apesar de ter uma acumulação inicial nos tecidos com inflamação ou sarcomas, era rapidamente eliminada da circulação e não se observava um aumento do catabolismo da AMF nesses tecidos, nem uma acumulação adicional de [125 I] AMF com o tempo. De facto, a AMF quando se liga a proteases sofre uma alteração de conformação expondo os locais de ligação aos receptores sendo rapidamente eliminada.

Para além da inibição de proteases, tem-se sugerido outras funções para a AMF. A AMF inibe os mediadores da inflamação como a histamina, bradicinina e a prostaglandina E2. Por outro lado, foram também descritas propriedades de inibição da quimiotaxia dos polimorfonucleares (Van Gool e col., 1982), e Miyanaga e col. (1982), utilizando culturas de linfócitos estimulados por vários mitogénios como a ConA, o Lipopolissacarídeo (LPS) e a fito-hemaglutinina A (PHA) verificaram que a AMF tinha um efeito inibidor da

proliferação dos linfócitos após estimulação por lectinas. Teixeira e col. (1991) também verificaram que em culturas de linfócitos estimulados com ConA, a AMF causava uma redução da resposta proliferativa em cerca de 60%.

10. A família das α -macroglobulinas

A AMF e a DAP pertencem à superfamília das α -macroglobulinas (α Ms) que contém quer inibidores de proteases, quer componentes do sistema do complemento C3 e C4. Os membros desta família são proteínas que se encontram na circulação de peixes, anfíbios, pássaros e mamíferos, o que demonstra a sua importância filogenética. Na espécie humana, a família das α -macroglobulinas inclui a α 2M que é uma proteína do plasma normal e a PZP ("pregnancy zone protein") que aparece aumentada na gravidez. No rato existe a α 1M que é uma proteína do plasma normal, a AMF e a " α 1-inhibitor III" (α 1I3) que são proteínas plasmáticas de fase aguda, e a α 2M de origem decidual que é sintetizada durante a gravidez. A maior parte das α Ms são tetrâmeros constituídos por quatro sub-unidades idênticas, de cerca de 180 kDa, dispostas em dois pares de sub-unidades ligados por ligações não covalentes, estando estas por sua vez ligadas entre si por pontes dissulfureto. São também conhecidas formas diméricas como a PZP e monoméricas como a α 1I3 (tabela 2). A família das α Ms apresenta sequências altamente conservadas excepto numa zona denominada de "bait region", zona funcional que é clivada pelas proteases e que marca as diferenças entre os vários membros da família.

A α 2M humana foi inicialmente isolada por Schultze e col. (1955). A α 2M é uma glicoproteína contendo aproximadamente 10% em carboidratos (Dunn e Spiro, 1967). O nome α 2M indica duas das suas principais características: uma mobilidade electroforética igual a uma α 2-globulina e um elevado peso molecular. Só alguns anos mais tarde é que foram descobertas as propriedades de inibição de proteases que fazem desta proteína uma proteína única. Haverback e col. (1962) descobriram que quando a tripsina ou quimiotripsina eram adicionadas ao soro formavam complexos com uma proteína com uma mobilidade electroforética α 2. Estes estudos demonstraram que o local catalítico da enzima complexada continuava activo sobre substratos de baixo peso molecular, mas

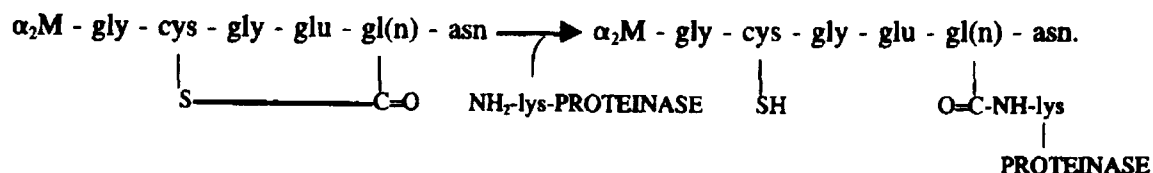
inactivo em relação aos de elevado peso molecular. Posteriormente, verificou-se que era a α_2M a molécula responsável pela ligação das proteases.

Tabela 2- Membros da família das α -macroglobulinas.

Proteína	Forma	Espécie
α_2M	tetrâmero	Homem
α_2M	tetrâmero	Rato
α_1M	tetrâmero	Rato
α_2M	tetrâmero	Ratinho
PZP	dímero	Homem
α_2M	dímero	Lagosta
α_1I_3	monómero	Rato
Murinoglobulina (MUG)	monómero	Ratinho

Barrett e Starkey, em 1973, propuseram que a α_2M formava complexos com as proteases segundo um mecanismo que era explicado pela hipótese da "ratoeira" ou "trap hypothesis". Segundo esta hipótese, a protease inicia a reacção por corte numa ligação peptídica perto do centro da sub-unidade (Barrett e Starkey, 1973; Harpel, 1973). Cerca de dez diferentes ligações peptídicas podem servir como o local inicial de corte, dependendo da especificidade da protease, mas todas estas ligações peptídicas estão localizadas numa pequena sequência denominada de "bait region" (Barrett e Starkey, 1973; Sottrup-Jensen e col. 1984), cuja sequência é variável de membro para membro da família. As proteases ao realizarem a clivagem das "bait regions" originam a hidrólise das ligações tioéster da αM , causando uma alteração da conformação da molécula, ficando a enzima aprisionada no seu interior por ligações covalentes e não covalentes. Cada sub-unidade possui uma ligação tioéster. A activação da ligação tioéster β -cisteinil- γ -glutamilo, proporciona um potencial local para a ligação covalente da protease, bem como de outros agentes nucleófilos (Sottrup-Jensen e col, 1981). Assim, a ligação da protease ocorre por formação de ligações amida entre os grupos amina dos resíduos de lisina da protease e os grupos glutamilo da ligação tioéster, segundo a equação a seguir

indicada. O local activo da protease permanece livre e a protease retém actividade sobre substratos de baixo peso molecular. Todavia, não consegue reagir com substratos de elevado peso molecular por impedimento estérico.



A alteração de conformação origina ainda a exposição de locais de ligação a receptores de vários tipos de células, os quais estavam previamente escondidos no interior da molécula antes da alteração de conformação (Kaplan e Nielsen, 1979). A forma transformada da αM , em contraste com a forma nativa, é rapidamente removida da circulação e é interiorizada por endocitose via receptor para a $\alpha 2M$.

Como foi referido, as αM s sofrem uma modificação da sua conformação por ligação às proteases. No entanto, pode ocorrer um ataque nucleofílico directo às ligações tioéster por parte de amins primárias como a metilamina, que resulta também numa alteração da conformação e sem alterações na "bait region" (Björk e Fish, 1982). Esta alteração de conformação também leva à exposição dos locais de ligação aos receptores. A semelhança na mudança de conformação induzida por proteases e amins nas várias αM s sugere uma complexa interligação entre a clivagem da "bait region" e a clivagem do grupo tioéster no controlo do estado conformacional das αM s.

A $\alpha 2M$ é um inibidor das quatro classes de proteases (Barrett e Starkey, 1973). A alteração da conformação após reacção com a protease resulta numa contracção e organização da molécula que pode ser estudada por várias técnicas. No entanto, a técnica mais simples e mais frequentemente usada para monitorizar essa mudança é a electroforese nativa em gel de poliacrilamida (Barrett e col. 1979), visto que, após reacção com a protease, a mobilidade da $\alpha 2M$ está aumentada. Este processo foi referido como a transformação da forma de menor mobilidade -s ("slow") na forma -f ("fast") de maior mobilidade.

A $\alpha 2M$ é um dímero de dímeros. É possível obter artificialmente dímeros da $\alpha 2M$, semelhantes à PZP, funcionalmente activos como inibidores de proteases. Este facto

sugere que a α_2M é um inibidor bivalente, possivelmente contendo locais independentes de ligação de proteases (Sottrup-Jensen, 1994). Por outro lado, a PZP e os dímeros da α_2M agrupam-se em tetrâmeros após ligação às proteases, sugerindo que os vários monómeros interagem para formar um local de ligação da protease no tetrâmero. Quando a protease e a α_2M se ligam parece que pelo menos duas "bait regions", mas em muitos casos as quatro, sofrem clivagem. A protease ligada inicialmente tem acesso não só à "bait region" do outro monómero desse dímero onde ocorreu o ataque inicial, mas também aos monómeros do outro dímero. Como resultado, a protease pode ficar ligada aos dois monómeros de um dímero e a dois monómeros pertencentes a diferentes dímeros (Sottrup-Jensen, 1994). Deste modo, a molécula de α_2M constitui uma só unidade funcional que pode aprisionar uma ou duas moléculas de protease conforme o seu tamanho. A α_2M é capaz de ligar duas proteases do tamanho da tripsina mas só consegue ligar uma molécula de plasmina, já que a ligação da primeira molécula de plasmina parece reduzir o acesso da segunda.

Vários modelos cinéticos complexos foram propostos para a previsão da estequiometria da ligação para diferentes proteases (Larsson e col., 1989). Em 1985, Feldman e col., propuseram um modelo para a α_2M compatível com os estudos estruturais e funcionais realizados até à data. Este modelo ainda hoje é aceite para explicar a alteração conformacional da molécula após ligação às proteases, assim como o reconhecimento dos locais de ligação aos receptores, e ainda a previsão estequiométrica das razões de ligação proteína/proteases (Fig.5). O modelo refere que as "bait regions" e os tioésteres estão localizados centralmente, relativamente juntos e voltados para o lúmen da cavidade que se forma na α_2M após clivagem da "bait region".

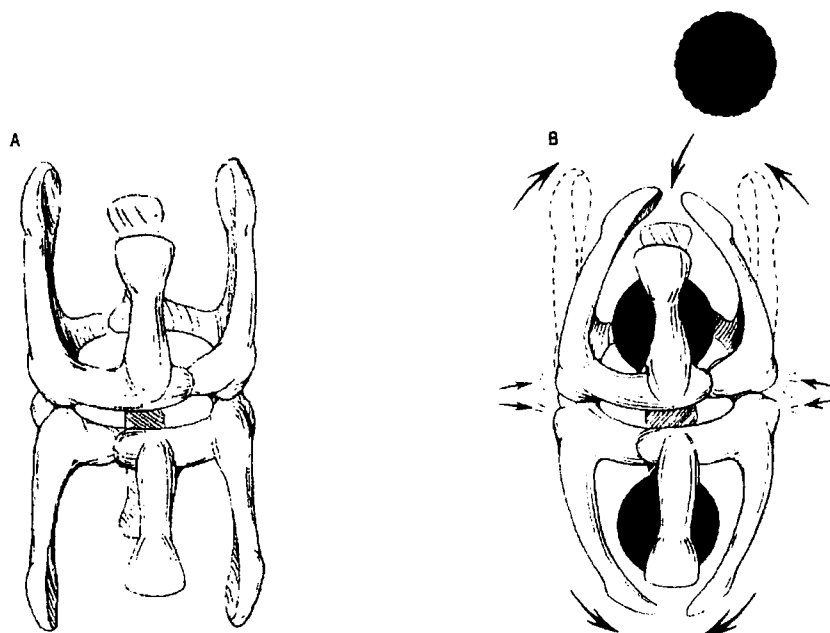


Figura 5 - Modelo da estrutura da α_2M . No modelo, a proteína com as suas 4 sub-unidades tem uma estrutura cilíndrica com duas metades funcionais e contém dois braços móveis em cada metade. O mecanismo de "ratoeira" para reter a protease é realizado pelo movimento desses braços móveis. Os tioésteres estariam próximo dos locais de ligação às proteases e do braço móvel de cada sub-unidade, organizados em pares e juntos na base dos braços móveis, separados pelo plano que divide a molécula em duas metades funcionais. A clivagem do tioéster faria com que o braço móvel se fechasse.

(A)- Molécula nativa; (B)- Alteração conformacional da molécula após reacção com a protease e exposição dos locais de ligação aos receptores representados pelas setas centrais (adaptado de Feldman e col., 1985).

10.1. A "bait region"

A "bait region" é uma pequena sequência de aminoácidos que contém vários locais susceptíveis à clivagem por parte das proteases. Esta região apresenta uma grande diversidade de sequências, em tamanho e composição, entre diferentes αMs , já que a restante sequência é homóloga entre membros, e a "bait region" fica compreendida entre áreas altamente conservadas (Sottrup-Jensen e col., 1989).

Os locais susceptíveis à clivagem proteolítica foram já identificados e correspondem de um modo geral às necessidades de especificidade de substrato das proteases. A diversidade das "bait regions" resulta num diferente comportamento das várias αMs em relação às diferentes proteases. Assim, várias proteases como a tripsina, quimiotripsina, elastase pancreática e leucocitária reagem rapidamente com a α_2M

humana, enquanto que proteases como a trombina e activadores do plasminogénio reagem lentamente. Por outro lado, a colagenase derivada dos fibroblastos humanos cliva as "bait regions" da $\alpha 2M$ humana e da $\alpha 1M$ do rato rapidamente, mas muito lentamente as da $\alpha 1I3$ do rato e da PZP humana.

10.2. A ligação tioéster

Os tioésteres internos foram só encontrados nas αMs e nas proteínas do complemento C3 e C4. Na família das αMs , as ligações tioéster existem em todos os membros excepto nas αMs do ovo (Sottrup-Jensen, 1994). O tioéster está localizado num extremo de uma região altamente conservada na família e que é constituída por cerca de 200 resíduos. A sequência conservada da região do tioéster é gly-cys-gly-glu-gln-asn. A formação do tioéster parece ocorrer por ataque directo do grupo tiólico à amida da gln sendo a ligação cys-glu projectada para o interior da molécula (Fig. 6)

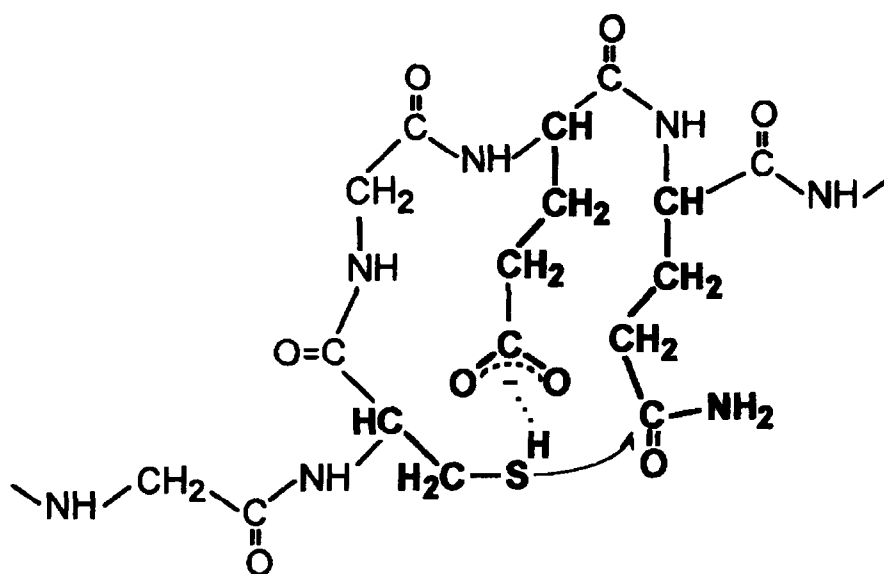


Figura 6 - Mecanismo proposto para a formação do tioéster no interior da molécula da $\alpha 2M$. A sequência conservada da região do tioéster nas αM é a sequência gly-cys-gly-glu-gln. A formação do tioéster ocorre por ataque do grupo tiólico da cisteína ao grupo amida da glutamina (retirado de Feinman, 1994).

Na molécula da α M o tioéster estará provavelmente localizado numa pequena bolsa hidrofoba parcialmente inacessível aos solventes. Como resultado da clivagem da "bait region" os tioésteres emergem das bolsas hidrofobas onde estavam escondidos e reagem com agentes nucleófilos incluindo os grupos ϵ -amina dos resíduos de lisina da protease. Assim, como resultado da clivagem da "bait region" a reactividade do tioéster fica muito aumentada por um curto espaço de tempo, durante o qual reage rapidamente com agentes nucleófilos, podendo ocorrer a ligação covalente com a protease (Sottrup-Jensen e col., 1981). O bloqueio dos resíduos de lisina da protease reduz significativamente a ligação covalente da protease, sugerindo que esta ligação será realizada sobretudo à custa da formação de ligações amida ϵ -lys(protease)— γ -glu(α M). No entanto, na ligação covalente poderão estar também envolvidos não só os grupos amina mas também os grupos OH da ser, thr e tyr e os átomos N dos resíduos de his (Sottrup-Jensen, 1994). Por outro lado, pequenas aminas primárias como a metilamina podem penetrar nas bolsas hidrófobas e reagir com os tioésteres na ausência de proteases. Esta reacção causa uma mudança de conformação que é praticamente idêntica à causada pela protease (Gonias e col., 1982). No entanto, o acesso ao tioéster nas α Ms nativas pode ser difícil se se tratar de uma amina ramificada, como a dimetilamina, e com as aminas de maior peso, como a n-butilamina.

10.3. O local de ligação aos receptores

O local de ligação aos receptores está localizado num domínio de 138 resíduos no terminal carboxílico, nos extremos dos braços da α 2M. Este domínio pode ser obtido por digestão parcial das α Ms tratadas com metilamina. Tomando este domínio isoladamente, verifica-se que a ligação aos receptores celulares é específica mas de baixa afinidade, o que sugere que outras partes da estrutura da α M são importantes para a manutenção da estrutura própria desse domínio (Sottrup-Jensen e col., 1986). A α 2M nativa não é reconhecida pelos receptores e permanece no plasma, enquanto a α 2M complexada, quer com proteases quer com aminas, é rapidamente reconhecida pelos receptores existentes nos hepatócitos, fibroblastos, monócitos/macrófagos e sinciciotrofoblasto e rapidamente

eliminada da circulação (Jensen e col., 1988; Coukos e col., 1994). O tempo de semi-vida dos complexos em circulação é cerca de 2-5 min. A ligação com os receptores celulares é de alta afinidade ($K_d=1$ nM, a 4°C) e independente do tipo de protease complexada (Enghild e col., 1989).

O receptor da $\alpha_2\text{M}$ foi isolado e clonado, sendo surpreendentemente idêntico ao receptor das LDL, o "LDL-receptor-related protein" (LRP) (Strickland e col., 1990). A sequência de acontecimentos que levam à interiorização por endocitose e degradação dos complexos de $\alpha_2\text{M}$ -proteases poderá ser análoga à das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Mais recentemente, Misra e col. (1994) identificaram em macrófagos um segundo tipo de receptor para a $\alpha_2\text{M}$, com proteína G acoplada e transdutor de sinal intracelular envolvendo um aumento de Ca^{2+} e de inositol trifosfato. Embora a função exacta deste receptor não seja conhecida, foi sugerido que ele poderia estar envolvido na regulação da função dos macrófagos, controlando a produção de proteinases, prostaglandina E2 e agentes quimiotácticos (Chu e col., 1994).

10.4. A função das α -macroglobulinas

As funções da família das αMs não são totalmente conhecidas. No entanto, não foram ainda detectados estados de deficiências em $\alpha_2\text{M}$ no Homem. Isso pode significar que essa deficiência ou é fenotipicamente silenciosa ou letal *in utero*. Várias funções biológicas têm sido atribuídas às αMs . A primeira função a ser descoberta foi a capacidade de inibição de proteases. As αMs poderão ter um papel importante no controlo da actividade das proteases, não porque exerçam uma inibição directa sobre os seus locais activos, mas porque formam complexos com as proteases que são rapidamente removidos da circulação. É evidente que existem inibidores de proteases específicos, tanto em circulação como nos tecidos, mas as αMs , para além de exercerem o controlo sobre as proteases, podem funcionar como reserva em determinadas condições, relativamente a outros inibidores, que eventualmente entrem em exaustão, em processos como a coagulação e a fibrinólise.

As proteases alvo para as α Ms podem ser as encontradas na matriz extracelular que participam no crescimento e remodelação tecidulares ou podem ser as libertadas durante o metabolismo celular. A indução da síntese da PZP na circulação materna, da α 2M na circulação materna e tecidos fetais do rato e nos estados inflamatórios (Gehring e col., 1987) sugere que as α Ms fazem aumentar o potencial existente para a depuração de proteases nestas condições. Na família das metaloproteases, a colagenase intersticial é rapidamente inibida pela α 2M. A relativa importância da α 2M em relação aos membros da família TIMP ("tissue inhibitor of metalloproteinase") na regulação das colagenases dependerá provavelmente das concentrações relativas de cada inibidor em cada ambiente. A α 2M é também um inibidor da catepsina D (Thomas e col., 1989) e da catepsina B (Starkey e Barrett, 1973). Assim, muitas das proteases que estão potencialmente envolvidas na invasão tumoral e metástases reagem com a α 2M. Por controlo da actividade das proteases, as α Ms podem modular reacções na resposta imunológica (Hubbard e col., 1981) e podem também contribuir para os mecanismos de defesa contra agentes patogénicos invasores.

A forma nativa da α 2M e a activada apresentam diferentes efeitos nos ensaios biológicos. A α 2M complexada com proteases diminui a resposta dos linfócitos T a mitogénios, antigénios e aloantigénios (Hubbard e col., 1981; Mannhalter e col., 1986; Hoffman e col., 1987; Heumann e Vischer, 1988; Petersen e col., 1989). Esses efeitos foram explicados por Mannhalter e col. (1986) que propuseram que o alvo dos complexos de α 2M-proteases seriam as interleuquinas estimuladoras dos linfócitos T. De facto, estudos subsequentes demonstraram que a IL-2 era degradada e inactivada pelas proteases ligadas à α 2M (Borth e Teodorescu, 1986). Por outro lado, a α 2M nativa potencia a resposta T contra alguns antigénios (Mannhalter e col., 1986), que poderão ligar-se à α 2M ficando protegidos de proteólise. Além disso, a α 2M poderá funcionar como transportador de antigénios para dentro dos macrófagos por ligação ao receptor e endocitose, amplificando o processamento do antigénio e a sua apresentação aos linfócitos T (Chu e Pizzo, 1993).

A função das α Ms como transportadoras de outras moléculas é já conhecida desde algum tempo. Em 1982, Koo propôs que a actividade supressora de tumores exibida pela α 2M, purificada do plasma de ratinho, era devida ao facto de a α 2M ser um transportador

de moduladores da resposta imune. Outros investigadores também sugeriram este efeito transportador para explicar actividades da $\alpha 2M$ na resposta imune (Hubbard e col., 1981). De facto, mais recentemente foi descoberta a propriedade de ligação da $\alpha 2M$ a citocinas e factores de crescimento e a lista de ligandos tem vindo a aumentar de ano para ano. Assim temos como ligandos: a IL-1 β (Borth e Luger, 1989; Borth e col., 1990), a IL-6 (Matsuda e col., 1989), a IL-2 (Legrès e col., 1995), o factor de crescimento plaquetário ("platelet derived growth factor"-PDGF; Huang e col. 1984), o factor de crescimento fibroblástico básico ("basic fibroblast growth factor"-bFGF; Dennis e col., 1989), o factor de crescimento de nervos ("nerve growth factor"-NGF; Ronne e col., 1979), o TGF- $\beta 1$ (Huang e col., 1988; O'Connor-MacCourt e Wakefield, 1987), o TGF- $\beta 2$ (LaMarre e col., 1990a,b; Danielpour e Sporn, 1990; Webb e col., 1994), o TNF- α (Wollenberg e col., 1991), a insulina (Chu e col., 1991), o factor de crescimento epidérmico ("epidermal growth factor"-EGF; Gettins e Crews, 1993) e a hormona do crescimento (Kratzsch e col., 1996).

Em alguns casos a $\alpha 2M$ promove um aumento da actividade das citocinas enquanto que em outros causa uma inibição dessa actividade. Assim, a ligação das citocinas à $\alpha 2M$ é um assunto controverso e já lhe foram atribuídos possíveis papéis fisiológicos como a eliminação de citocinas, a protecção das células vizinhas dos efeitos tóxicos das citocinas, a protecção das citocinas da digestão por proteínases e o transporte de citocinas até às células alvo que apresentem receptores para a $\alpha 2M$.

O modo como a $\alpha 2M$ liga as citocinas é também um assunto controverso e muitos estudos contraditórios foram publicados, provavelmente devido ao facto de os estudos iniciais não levarem em conta o estado conformacional da molécula. O tipo de interacção entre a $\alpha 2M$ e as citocinas varia, existindo diferenças na afinidade destas moléculas para a $\alpha 2M$ segundo o seu estado conformacional. A $\alpha 2M$ pode interagir com as citocinas segundo três mecanismos (tabela 3). O primeiro mecanismo pode ser exemplificado pelo TGF- $\beta 1$ e $\beta 2$. Estas citocinas ligam-se à forma "fast" (Huang e col., 1988; LaMarre e col., 1990a,b; Hall e col., 1992) e a interacção é predominantemente não covalente e reversível. Outras citocinas interactuam por um mecanismo que primariamente envolve intercâmbio tiol-dissulfureto como é o caso da IL-1 β (Borth e col., 1990). Antes da hidrólise ou aminólise da ligação tioéster, a $\alpha 2M$ não possui resíduos de

cisteína livres, pelo que o mecanismo de intercâmbio tiol-dissulfureto é limitado exclusivamente à forma "fast". O terceiro mecanismo de interação da $\alpha 2M$ com as citocinas é o que se verifica com a insulina. Esta liga-se por ataque nucleofílico aos tioésteres nascentes durante a alteração da conformação (Chu e col., 1991). O mesmo mecanismo se verifica em relação ao EGF (Gettins e Crews, 1993). Aparentemente, a $\alpha 2M$ parece ser uma molécula predisposta a ligar todas as citocinas existentes nas células, mas foram já descritas citocinas como o interferão- γ (Gonias e col., 1989) e o CSF (Hussaini e col., 1990) que não demonstram afinidade significativa para com a $\alpha 2M$.

Tabela 3- Ligação de citocinas e factores de crescimento à $\alpha 2M$.

Autores	citoquina	tipo de ligação
Ronne e col. (1979)	NGF	à forma "slow"
Huang e col. (1984)	PDGF	à forma "slow"
O'Connor e col. (1987)	TGF- $\beta 1$	à forma "slow"
Huang e col. (1988)	TGF- $\beta 1$	à forma "fast"
Matsuda e col. (1989)	IL-6	à forma "slow"
Borth e Luger (1989)	IL-1 β	à forma "fast"
Dennis e col. (1989)	bFGF	à forma "slow"
Gonias e col. (1989)	interferão- γ	sem afinidade
Hussaini e col. (1990)	CSF	sem afinidade
Danielpour e Sporn (1990)	TGF- $\beta 2$	à forma "fast"
LaMarre e col. (1990)	TGF- $\beta 2$	à forma "fast"
Wollenberg e col. (1991)	TNF- α	à forma "fast"
Chu e col. (1991)	insulina	à forma "nascente"
Hall e col. (1992)	TGF- $\beta 1$	à forma "fast"
Gettins e Crews (1993)	EGF	à forma "nascente"
Webb e col. (1994)	TGF- $\beta 2$	à forma "slow"
Legrès e col. (1995)	IL-2	à forma "slow", "fast"
Kratzsch e col. (1996)	Horm. crescim.	à forma "fast"

Em condições patológicas a actividade antiproteásica da $\alpha 2M$ pode ser muito importante, não se sabendo se em condições fisiológicas normais a regulação de proteases, como a plasmina ou a colagenase intersticial, pela $\alpha 2M$ assume um papel

relevante. Por outro lado, a ligação da $\alpha 2M$ a citocinas poderá resultar numa modulação das suas actividades, exercendo assim a $\alpha 2M$ um papel importante na concentração final de factores de crescimento e citocinas disponíveis para a célula. No entanto, o significado biológico destas interações não está esclarecido, sendo necessários estudos mais detalhados. O modelo da Fig. 7, tenta explicar as interações que podem ocorrer entre a $\alpha 2M$ e as citocinas.

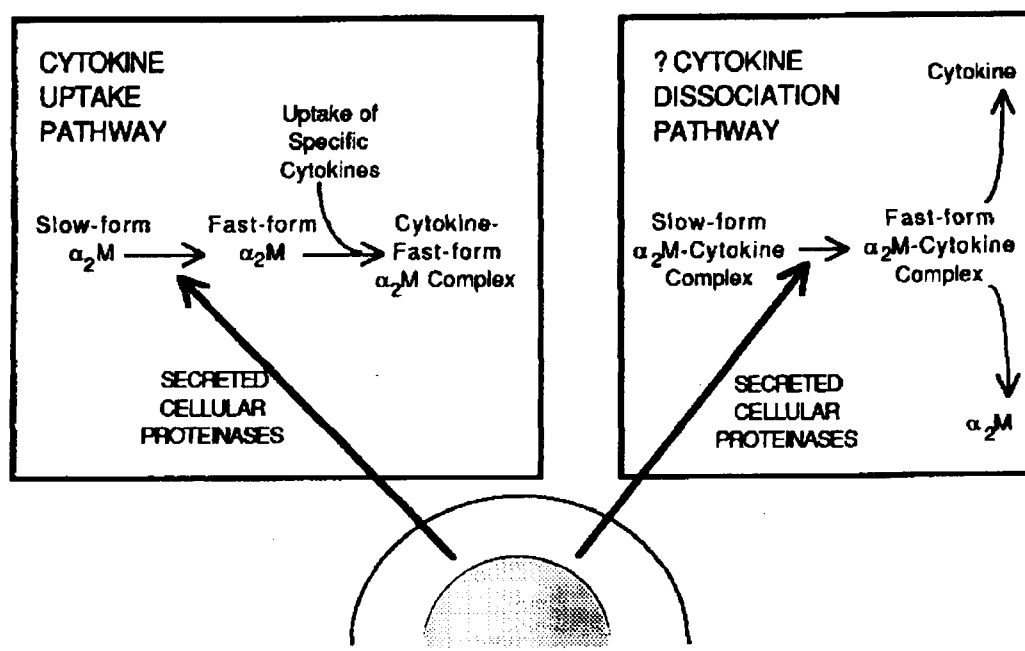


Figura 7 - A $\alpha 2M$ reage com as quatro principais classes de proteases celulares. A reacção com a protease provoca uma modificação conformacional na molécula de $\alpha 2M$ e uma alteração na afinidade para as citocinas. A captura e libertação de citocinas pela $\alpha 2M$ em resposta a proteases celulares poderá funcionar como um mecanismo para regulação autócrina e parácrina do crescimento celular (retirado de Gonias, 1992).

As células secretam proteases que reagem com a $\alpha 2M$ e alteram a sua conformação modificando a sua afinidade para as citocinas. Aparentemente, a alteração do estado conformacional provoca um aumento da ligação a citocinas não sendo ainda claro se a alteração de conformação determina uma libertação de citocinas ligadas, como foi proposto neste modelo. De qualquer forma e de acordo com este modelo, a $\alpha 2M$ é capaz de regular o crescimento, diferenciação e outras propriedades celulares de um modo parácrino e autócrino. De facto, após a ligação aos receptores de membrana da $\alpha 2M$, as

diferenças nos mecanismos de ligação entre os diferentes ligandos e a $\alpha 2M$ podem determinar a sua rota nas vias endocíticas/lisossómicas celulares. Assim, peptídeos irreversivelmente ligados poderão ser internalizados com a $\alpha 2M$ e sofrerem proteólise, enquanto os que estão ligados reversivelmente podem dissociar-se e actuar intracelularmente, funcionando neste caso a $\alpha 2M$ como um simples transportador do ligando para o interior da célula.

OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

Tal como o Homem o Rato apresenta uma placentação do tipo hemocorial e por isso tem sido usado como modelo nos estudos que permitem elucidar como os compartimentos materno-fetais interactuam e as consequências desta interacção no bem estar fetal. Estes animais são particularmente importantes na análise dos processos que ocorrem no início da gravidez, especialmente nos períodos de peri-implantação e pós-implantação e no estudo dos efeitos *in vivo* de tratamentos maternos. Além disso, os roedores são um modelo muito útil para elucidar quais os tipos celulares e os mecanismos responsáveis por patologias da gravidez. Estudos recentes demonstraram a existência de uma complexa rede de interacções celulares e de citoquinas que asseguram o adequado crescimento da unidade feto-placentária. Perturbações nessa rede de citoquinas podem resultar num mau funcionamento da placenta e originar complicações como pré-eclampsia e atraso de crescimento intrauterino. No entanto, não se sabe ainda quais os tipos de células que especificamente contribuem para a produção de citoquinas e qual a sua localização nos locais de implantação. Uma área que tem sido de algum modo negligenciada é o tecido decidual, ou decidua, o tecido materno que está directamente em contacto com o trofoblasto. A principal proteína sintetizada pela decidua humana é uma proteína, a IGFBP-1, que liga o factor de crescimento tipo insulina-IGF-I. A sua função na decidua e na gravidez não é ainda conhecida. No entanto, na mãe, baixos níveis séricos de IGF-I estão associados com disfunção placentária e baixo peso à nascença, assim como, baixos níveis no cordão umbilical estão associados a retardamento de crescimento intrauterino. No rato, a principal proteína sintetizada pela decidua é a proteína associada à decidualização-DAP, uma $\alpha 2$ -macroglobulina. Esta proteína tecidular possui características imuno e fisicoquímicas semelhantes a uma $\alpha 2$ -macroglobulina plasmática de fase aguda (AMF). Um dos objectivos deste trabalho foi pesquisar, a nível estrutural, possíveis diferenças existentes entre a $\alpha 2M$ circulante e decidual. Deste modo, em primeiro lugar, deu-se uma particular atenção à sequenciação do DNA nas regiões correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF, uma vez que é esta a região que apresenta diferenças entre os vários membros da família das α -macroglobulinas, sendo as restantes sequências altamente conservadas. No âmbito dos estudos estruturais pretendeu-

se ainda verificar se uma possível diferença na composição em ácido siálico, entre as duas proteínas, era a responsável pela diferença de pontos isoeléctricos existentes.

Vários autores demonstraram em relação à $\alpha 2M$ humana a capacidade de ligação a proteases, citocinas e factores de crescimento. Sendo a DAP, tal como a AMF, uma $\alpha 2M$ que apresenta propriedades de inibição de proteases, começámos por estudar a possível ligação da DAP e AMF à interleucina-6, citocina sintetizada pela decidua. Por outro lado, sendo a principal proteína sintetizada pela decidua humana, uma proteína que liga os IGFs, e tendo estes factores um importante papel na gravidez, pretendeu-se determinar se a DAP, o principal produto sintetizado pela decidua do rato, poderia ter uma função equivalente à IGFBP-1 no ser humano. Para tal procedeu-se a estudos para averiguar a ligação da DAP e da AMF ao IGF-I e a existência de possíveis diferenças funcionais entre as duas proteínas.

A determinação dos locais de síntese, e dos diferentes tipos de células que poderão expressar a DAP, poderão dar informações importantes sobre a sua função na gravidez. Assim realizou-se, por hibridização *in situ*, um estudo da distribuição espacial e temporal da DAP e dos IGFs ao longo da gravidez, por forma a determinar quais as possíveis interrelações anatómicas na interface materno-fetal, esclarecer a possível função da DAP no tecido decidual durante a gravidez e a sua relação com os factores de crescimento tipo insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais biológicos

Estirpes bacterianas

E. coli DH5 α , *E. coli* TG2.

Vector

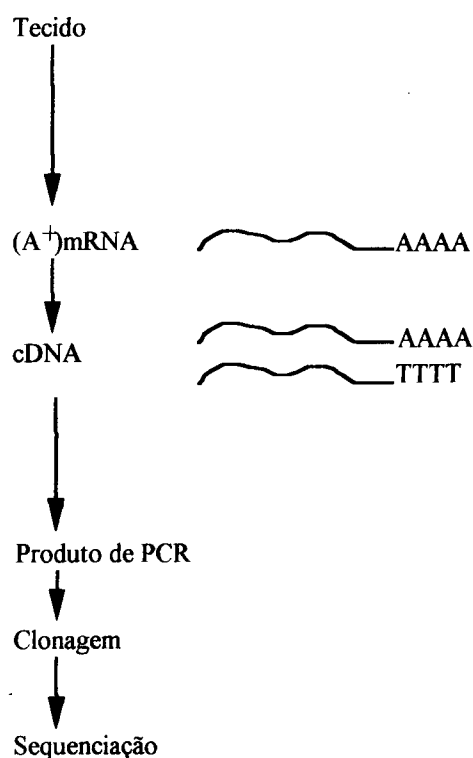
Utilizou-se o plasmídeo pBluescript KS (+/-) cujas características estão descritas no apêndice.

Animais

Ratos da estirpe Wistar (200-250g) foram criados em biotério com condições de 12hs luz do dia/ 12hs noite, com comida e água *ad lib*. Na manhã seguinte ao acasalamento, realizaram-se esfregaços vaginais. A presença de espermatozóides, foi considerada como indicativa do 1º dia de gravidez. A indução do decíduoma realizou-se no 5º dia de gravidez. Sob o efeito anestésico do éter fez-se uma pequena incisão na zona dorsal lateral por onde se exteriorizou parte do corno uterino. Injectaram-se 0,5 ml de óleo de amendoim no lúmen uterino. A mesma operação foi realizada para cada corno uterino. Todos os ratos foram mortos por distensão cervical após anestesia com éter. Quando necessária a fixação para a realização de blocos de parafina, os úteros foram imediatamente colocados em formol a 10%. Para a obtenção do tecido decidual os úteros foram removidos, seguindo-se a dissecação da decidua do endométrio e tecidos fetais segundo o método descrito por Bell (1979b).

A indução do estado inflamatório foi efectuada em machos por injeção subcutânea, na zona interior de cada coxa de 1 ml de terebentina em óleo de amendoim (1:1, v/v). Para a preparação de plasma de fase aguda colheu-se o sangue em heparina por punção cardíaca, 48 hs após a indução. Para a obtenção de soro de fase aguda o sangue foi centrifugado a 3.000 g durante 20 min. Para a preparação de RNA total, o fígado foi retirado 20 hs após indução do estado inflamatório.

2. Sequenciação das zonas correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF



O esquema representa a estratégia seguida para a sequenciação das zonas dos cDNAs correspondentes às "bait regions" da AMF e DAP. Partindo de poly(A)⁺ RNA, isolado de fígado de fase aguda e de decidua do 12^o dia de gravidez, sintetizaram-se os respectivos cDNAs por acção da transcriptase reversa. Efectuou-se a amplificação por PCR, usando os cDNAs como molde e "primers" desenhados de modo a possuírem uma elevada homologia para a região conservada, na vizinhança da "bait region" das α 2-macroglobulinas de rato e humana. Foi assim amplificada a zona de cDNA contendo a sequência codificante para a "bait region". Seguiu-se a clonagem dos produtos de PCR e sequenciação do DNA correspondente à "bait region" da DAP.

2.1. Extração de RNA total e isolamento de RNA poli(A)⁺

Para a extração de RNA total foi usada uma modificação da técnica descrita por Chomczynski and Sacchi (1987). O RNA total foi separado dos seus contaminantes por extração com fenol/clorofórmio passando para a fase aquosa, livre de DNA e proteínas. Na fase aquosa fez-se a precipitação com isopropanol.

Em dois tubos com 12 ml de solução desnaturante (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 42 mM, pH 7, β -mercaptoetanol 0,2 mM, N-laurilsarcosina 0,83%) colocaram-se separadamente 1g de tecido decidual, do 12º dia de gravidez, e 1g de fígado, 20 hs após indução de um estado inflamatório. Após homogenização no "Polytron" (Polytron Ultra-Turrax, T 25, Janke and Kunkel, IKA) durante 30-60 seg, adicionou-se 1,2 ml de acetato de sódio 2 M, pH 4, e agitou-se por inversão. Para a extração do RNA adicionou-se 12 ml da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1), agitando vigorosamente durante 20 seg. Deixou-se em gelo durante 15 min. Transferiu-se a mistura para um tubo Sorvall e centrifugou-se a 10.000 g durante 20 min a 4° C. Removeu-se cuidadosamente a fase aquosa para outro tubo igual e precipitou-se o RNA por adição de igual volume de isopropanol, ficando a -20° C durante 1 h ou durante a noite. A mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 20 min a 4° C. Ressuspendeu-se o "pellet" com 5 ml de solução desnaturante e adicionou-se igual volume de isopropanol para precipitação do RNA. Centrifugou-se novamente a 10.000 g a 4° C durante 20 min e o sedimento foi lavado com etanol a 70% arrefecido a 4° C. Deixou-se secar o sedimento e ressuspendeu-se em 2 ml de água destilada tratada com DEPC.

Retirou-se uma alíquota do mRNA isolado e adicionou-se tampão de amostra estéril (50% glicerol, 0,001 g de azul de bromofenol, DEPC 0,1%). Procedeu-se à electroforese num gel de agarose a 1,5% contendo 1 μ l de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1xTAE, durante 1-2 hs, a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hofer Scientific Instruments, USA), unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

A concentração de mRNA foi determinada espectrofotometricamente no "Shimazu-UV-260" (Shimazu Corporation Japan) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando como unidade de conversão: 1 unidade de A_{260} de RNA = 40 μ g/ml

A razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa do grau de pureza do ácido nucleico. Os valores compreendidos entre 1,8 e 2,0 correspondem a preparações de ácidos nucleicos suficientemente puras.

A preparação de RNA poly (A)⁺ foi feita com o "kit" PolyA Tract™ Promega. Este sistema usa partículas paramagnéticas contendo estreptavidina acoplada ("streptavidin MagneSphere™ particles") e um "primer" oligo(dT) biotilado que vai hibridar com o terminal 3' da região poly (A)⁺. Os produtos resultantes da hibridização são capturados através de um suporte magnético que atrai as partículas paramagnéticas. O RNA foi eluído da fase sólida por adição de água destilada tratada com DEPC.

Em tubo estéril adicionou-se 1,5 mg de RNA total e água destilada tratada até perfazer o volume de 2,43 ml. Após incubação a 65 ° C, durante 10 min (reação de desnaturação), foi imediatamente adicionada 10 µl de sonda biotilada oligo dT (150 pmols) e 60 µl de tampão 20x SSC, deixando a reação decorrer à temperatura ambiente durante 3 hs (reação de "annealing"). Dispersaram-se as partículas magnéticas por agitação suave do fundo do tubo. Capturaram-se as partículas colocando o tubo no suporte magnético. Após a remoção do sobrenadante, lavaram-se as partículas 3 vezes com 0,5x SSC (1,5 ml por lavagem). No final de cada lavagem as partículas foram capturadas no suporte magnético e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. Ressuspenderam-se as partículas em 0,5 ml de 0,5x SSC, juntou-se o conteúdo da reação de "annealing" e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. Capturaram-se as partículas que contêm o RNA em suporte magnético e removeu-se cuidadosamente o sobrenadante. Seguiram-se 4 lavagens com 0,1x SSC (1,5 ml por lavagem). A eluição do mRNA ocorreu com a ressuspensão das partículas em 500 µl de água destilada livre de RNAases fornecida no "kit". Capturaram-se as partículas com o suporte magnético e retirou-se a fase aquosa contendo o RNA para tubo estéril fornecido no "Kit". Em seguida, verificou-se a qualidade do RNA poly (A)⁺ por electroforese em gel de agarose e determinou-se a sua concentração, como referido anteriormente. Concentrou-se o RNA poly (A)⁺ por precipitação com acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e isopropanol (1/10) a -20°C, pelo menos durante 1h.

2.2. Síntese de cDNA de cadeia simples

A cadeia de cDNA foi sintetizada a partir dos RNA poly (A)⁺ do tecido decidual e do fígado de fase aguda usando o "Kit" da Gibco contendo como transcriptase reversa a enzima "Moloney Murine Leukemia Virus RNase H⁻ Reverse Transcriptase" (Gibco, BRL). Realizou-se a reacção, em tubo "ependorf", por adição sucessiva de 7 µl de água, 5 µl (5 µg) de RNA poly (A)⁺ e 4 µl de oligo (dT) (500 µg/ml). Incubou-se durante 10 min a 70 ° C e imediatamente a seguir arrefeceu-se em gelo. Adicionou-se 4 µl de tampão de reacção fornecido pelo "Kit" (Tris/HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 1 µl DTT 0,1M, 1 µl do "stock" misto de dNTPs (contendo 10 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 2 µl (5 000 units) do inibidor de RNAases "Human placental ribonuclease inhibitor" e 1 µl da transcriptase reversa (200 U). Colocou-se a 37 °C, durante 1 h e posteriormente a 95 ° C, durante 10 min. Após incubação, adicionaram-se 80 µl de água destilada. A concentração do produto de reacção foi determinada por leitura da absorvância a 260 nm, como referido para o RNA (1 unidade de A₂₆₀.de DNA=33 µg/ml). Como controlo negativo foram utilizadas as mesmas amostras às quais não foi adicionada a enzima.

2.3. "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Realizou-se a amplificação da zona de cDNA pretendida por PCR, usando os cDNAs como molde e "primers" específicos para as zonas do DNA a amplificar. Para o desenho dos "primers", alinharam-se em computador (programa PC Gene) as sequências de cDNA já descritas da α2M de rato e humana. Como as α-macroglobulinas constituem uma família de proteínas de elevada homologia, à excepção da região funcional da "bait region", as sequências dos "primers" foram desenhadas de modo a possuírem uma elevada homologia para a região conservada, na vizinhança da "bait region" imediatamente antes do início desta região e imediatamente após o seu final.

Usou-se como "primer sense" a sequência 5'-GACCTCACTGGCTTCCCT-3' e como "primer anti-sense" a sequência 5'-ACCACCACCAAGTCCCAG-3'. Estas sequências de oligonucleótidos foram sintetizadas no Gene Assembler Plus (Pharmacia).

As reacções de amplificação realizaram-se no "termocycler 60 bio-med" (B. Braun) segundo o protocolo do "kit" GeneAmp^R PCR (Perkin Elmer Cetus). Após várias experiências, usaram-se como condições óptimas de amplificação: temperatura de "annealing" 55°C, concentração de "primers" 0,1mM, concentração de DNA 125 ng e 34 ciclos de amplificação. Utilizou-se a enzima *AmpliTaq* DNA polimerase (Perkin-Elmer, Cetus) e concentrações finais de 200 µM de cada dNTP. Em condições optimizadas, a amplificação realizou-se num volume final de 100 µl constituído por: x µl de DNA (concentrações variaram entre 50 e 200 ng), 2 µl de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Boeheringer Mannheim) numa concentração final de 10 mM, 10 µl de 10x tampão de PCR [100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% (p/v) gelatina, Perkin-Elmer, Cetus], 0,05-0,2 µM de cada "primer" e o volume foi completado com água destilada estéril. Usaram-se como condições de reacção: desnaturação prévia a 98° C durante 5 min seguida de 34 ciclos. No 1º ciclo fez-se uma desnaturação a 98° C durante 5 min seguida de 30 seg a 55°C e 2 min a 72°C. No fim deste ciclo adicionou-se 0,5 µl (2,5 U) da enzima *AmpliTaq* DNA polimerase. Seguiram-se 34 ciclos constituídos por desnaturação (15 seg a 96°C), "annealing" (30 seg a 55 °C) e síntese (2 min a 72°C). Foram amplificados os DNA correspondentes às "bait region" da DAP e AMF, usando-se como controlo DNA genómico de rato. Como controlo negativo, na reacção de amplificação o DNA foi substituído por água.

Alíquotas (15-20 µl) dos produtos de PCR obtidos foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 3% (Nusieve GTG) contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE durante 3 hs, a 45 volts. Determinaram-se os pesos moleculares dos fragmentos usando como padrão de DNA λ digerido com *Hind*III e λ digerido com *Pvu*II. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA), unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

2.4. Isolamento de DNA de plasmídeo

Foi usado o "kit" da Promega-"Magic Minipreps™ DNA Purification System". Centrifugaram-se 2 a 3 ml de uma cultura ON de *E. coli*. Ressuspenderam-se as células em 200 µl de solução de ressuspensão (50 mM, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A) e transferiram-se para "eppendorf". Juntaram-se 200 µl de solução de lise (0,2M NaOH, 1% SDS) e misturou-se por inversão. Adicionaram-se 200 µl de solução de neutralização (2,5 M KOAc, pH 4,8) e misturou-se novamente por inversão. Centrifugou-se 5 min a 14.000 r.p.m. e separou-se o sobrenadante para outro "eppendorf". Adicionou-se 1 ml de resina "Magic Minipreps DNA Purification", misturou-se por inversão e aplicou-se na mini-coluna "Magic Minipreps Columns". Lavou-se a mini-coluna com 2 ml de solução de lavagem (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, diluída a 1:1 em etanol absoluto). A secagem da mini-coluna foi feita por microcentrifugação, durante 20 seg. Adicionaram-se 50 µl de água pré-aquecida a 65°C e ao fim de 1 min o DNA de plasmídeo foi eluído da coluna por microcentrifugação, durante 20 seg. Uma alíquota do DNA foi analisado em gel de agarose a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs, a 70-80 volt. Conservou-se o DNA plasmídico a -20°C.

2.5. Preparação de células competentes

Inocularam-se 5 ml de meio de cultura LB (vêr apêndice) com uma colónia isolada de *E. coli* DH5α, repetindo o processo para uma colónia isolada de *E. coli* TG2, e incubaram-se durante a noite, a 37 ° C. Inocularam-se 200 ml de meio LB com 2 ml da cultura que cresceu durante a noite, e incubou-se a 37° C, com agitação, durante cerca de 2 hs até a densidade óptica a 600 nm ser da ordem dos 0,3-0,4. Após incubação em gelo durante 30 min, a cultura foi centrifugada a 2.000 g durante 5 min, a 4° C. Rejeitou-se o sobrenadante e o sedimento foi cuidadosamente ressuspenso em 20 ml de CaCl₂ 10 mM estéril e arrefecido em gelo e colocou-se em gelo durante 30 min. Centrifugou-se a 2.000 g durante 5 min, a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenso o sedimento em 10

ml de 10 mM CaCl₂ estéril. As células obtidas apresentam o máximo de competência ao fim de 16 horas e mantêm-se viáveis durante 4 dias, a 4°C. Quando não se utilizaram de imediato, foram congeladas em 10% de glicerol e conservadas a -70°C.

2.6. Clonagem dos produtos de PCR

O fragmento de DNA correspondente à "bait region" da DAP, obtido por PCR, foi clonado no vector pBluescript KS (pKS) por ligação coesiva das respectivas extremidades de acordo com a metodologia apresentada no ponto 2.6.1. A identificação de clones foi efectuada por "colony screening" (Sambrook e col. 1989) utilizando como sonda os produtos de PCR.

2.6.1. Ligação de fragmentos de DNA

Realizou-se uma análise de restrição ao vector pKS com as enzimas de restrição *Pst* I, *EcoRV*, *PvuI*, *PvuII* e também uma digestão dupla com *BamHI* e *HindIII*. Aferiu-se a pureza do vector e realizou-se uma reacção de PCR para adição de dTTP ao vector pKS (5µg) cortado com *EcoRV*. Num volume de 100 µl adicionou-se 2,5U de *Taq* DNA polimerase em tampão apropriado e o dTTP como único nucleótido, na concentração final de 20 µM. A reacção efectuou-se a 72 °C, durante 2 hs. O DNA foi extraído com fenol e precipitado com 3M acetato de sódio (0,1 vol) e etanol (1 vol) a -20°C. Efectuou-se nova reacção de PCR nas condições anteriores com posterior extracção fenólica.

A banda contendo o "insert" (fragmento de DNA correspondente à "bait region" da DAP, resultante da reacção de PCR) foi cortada do gel de agarose "low melting", derretida a 65°C, durante 10 min, e depois conservada a 37°C. Determinaram-se as concentrações de vector e "insert" a utilizar, de modo a que a razão molar do vector para o "insert" fosse de 1:3, num volume final de 20 a 60 µl:

Quantidade de vector (μg)	=	3x Quantidade de "insert" (μg)
Peso do vector (kb)	=	Peso do "insert" (kb)

Em "epENDORF" colocaram-se 30 μl (20 ng) DNA "insert", 1 μl (75 ng) de vector pKS adicionado de dTTP, 12 μl de tampão ligase, 6 μl de T4 DNA ligase, 12 μl de ATP 10 mM e completou-se o volume com água até 60 μl . Esta mistura foi incubada durante a noite a 22 °C.

2.6.2. Transformação de células competentes

A 100 μl de células competentes colocadas em gelo, adicionaram-se em tubos separados, 1 μl (20 ng) de pKS nativo (controlo positivo), 1 μl (75 ng) de pKS adicionado de dTTP, 30 μl da reacção de ligação e 30 μl de água. Após incubação em gelo durante 30 min, colocaram-se as células a 37°C, durante 2 min, deixando novamente em gelo 1-2 min (choque térmico). Adicionou-se, à temperatura ambiente, 400 μl de meio LB aquecido a 37°C e incubou-se a 37 °C, durante 1 h. Como controlo negativo utilizaram-se 100 μl de células competentes e 400 μl de meio LB. Plaquearam-se 125 μl de cada amostra em placa de L-agar contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 0,1mM de IPTG e 40 $\mu\text{g/ml}$ de X-gal, e incubou-se durante a noite a 37°C. Calculou-se a eficiência de transformação, ou seja, o número de transformantes/ml/ μg DNA.

2.6.3. Isolamento e crescimento de recombinantes

As colónias recombinantes (brancas) foram removidas e colocadas em 5 ml de meio LB contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Incubou-se durante a noite, a 37°C, com agitação. Fez-se o isolamento do DNA de plasmídeo utilizando "mini-preps" (Magic Minipreps™ DNA Purification System, Promega) e verificou-se por digestão enzimática a presença ou ausência do "insert".

Para aferir quais os transformantes que possuíam o "insert" realizaram-se digestões enzimáticas simples com *EcoRV*, *HindIII*, e digestões duplas com *EcoRV/HindIII*, *HindIII/BamHI*. Determinaram-se os pesos moleculares dos fragmentos resultantes da digestão, por electroforese em gel de agarose a 1,2%, usando como padrão de DNA λ digerido com a *HindIII*.

2.7. Marcação de sondas com α [^{32}P]dCTP

Para o "Southern blot" a sonda foi marcada com o "Multiprime DNA Labelling System" (Amersham, UK). A sonda usada no "Northern blot" foi marcada com a desoxinucleotidil terminal transferase (Sambrook e col., 1989).

Para o "southern" preparou-se um gel de agarose "low melting point" (Sea plaque GTG, FMC) a 3% e aplicou-se o produto de PCR. Na corrida foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) "Unidade Mini Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 33". Cortou-se a banda correspondente ao fragmento de DNA e colocou-se num "eppendorf" estéril contendo 50 μl de TE. Derreteu-se a agarose num banho de água a 65°C, durante 10 min. Diluiu-se o DNA em água por forma a ter 20 ng de DNA num volume final de 31 μl . Ferveu-se durante 3 min e adicionou-se 10 μl de tampão de marcação (dATP, dGTP e dTTP 2 mM de cada em 250 mM Tris/HCl, pH 7,8, 25 mM MgCl₂ e 5 mM β -mercaptoetanol), 5 μl da solução contendo "primer" (BSA e oligonucleótidos), 2 μl de α [^{32}P] dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) e 2 μl de enzima klenow (1U/ ml), num volume final de 50 μl . Fez-se a incubação a 37 °C, em recipiente de chumbo, durante 1-2 hs. Adicionou-se azul de bromofenol e aplicou-se a sonda na coluna de Sephadex G-50, previamente lavada com TNE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Recolheu-se a sonda em "eppendorf", desnaturou-se o DNA por fervura, durante 3 min, e conservou-se em gelo. A actividade específica da sonda era de 2×10^9 cps/ μg DNA.

Para o "Northern blot" utilizou-se como sonda o "cocktail" de oligonucleótidos usado na reacção de hibridização *in situ*, sendo a reacção catalizada pela desoxinucleotidil terminal transferase (TdT) (Boehringer Mannheim) e a marcação foi feita

com $\alpha[^{32}\text{P}]$. Neste método de marcação a concentração de enzima é crítica bem como a de DNA. As condições de reacção usadas foram: 3 μl DNA (686 ng), 10 μl de tampão de reacção TdT (Boehringer Manheim), 1 μl de TdT, 5 μl de CoCl_2 , 1 μl de $\alpha[^{32}\text{P}]$ e 30 μl de água.

A sonda foi filtrada em Sephadex G 50 e fervida durante 3 min. A actividade específica da sonda era de 2×10^9 cps/ μg DNA.

2.8. Electroforese do DNA para "Southern Blot"

Para confirmação da clonagem em pKS dos fragmentos obtidos por PCR, realizou-se um "Southern blot". Procedeu-se à digestão de 1 μg de DNA com *Hind*III e *Bam*HI, durante 2hs, a 37 °C. Adicionou-se 5 μl de azul de bromofenol e aplicaram-se as amostras e o padrão (λ cortado com *Hind* III) num gel de agarose a 1,5% em 1x tampão TAE. Fez-se a electroforese a 40 volts em 1x tampão TAE, durante 9 hs. Fotografou-se o gel e separou-se o padrão. Colocou-se o gel na solução de depuração (HCl 0,2 M) durante 15 min, lavou-se com água e colocou-se na solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 45 min. Lavou-se com água e o gel foi colocado por 15 min na solução de neutralização (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,001M EDTA). Procedeu-se à transferência das amostras, durante 16 hs para uma membrana de "nylon" (HybondN⁺ Amersham), em tampão 20x SSPE (3,6 M NaCl, 0,2M EDTA, 0,2 M fosfato de sódio, pH 7,7). Após a transferência, o gel foi colocado 30 min em solução de neutralização. A fixação foi feita na estufa a 80 °C, durante 2 hs. Fez-se a pré-hibridização (5x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5% SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmão) durante 3 hs, a 65°C. Marcou-se a sonda com $[^{32}\text{P}]$, (usou-se como sonda e controlo o próprio DNA de PCR), e adicionou-se à solução de pré-hibridização, ficando a incubar durante a noite, a 65 °C. Fizeram-se as lavagens em 2x SSPE contendo 0,1% de SDS por 20 min, a 65°C, e em 1x SSPE contendo 0,1% de SDS, durante 15 min, a 65°C. Procedeu-se à autoradiografia (Kodak, exposição a -70°C por 3 a 5 dias).

2.9. Digestão do DNA

A digestão do DNA foi feita com as enzimas de restrição específicas para cada DNA num "eppendorf" estéril de acordo com as recomendações de Sambrook e col. (1989). Adicionaram-se 2 µl de 10x tampão de digestão próprio para cada enzima, DNA (1-2 µg), 1 µl (10U/µl ou 20U/µl) enzima de restrição e água para um volume final de 20 µl. Misturou-se cuidadosamente, centrifugou-se 2 seg e incubou-se no banho a 37°C, durante 2 hs. Uma alíquota do DNA cortado foi analisada por electroforese em gel de agarose a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs, a 70-80 volt. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

2.10. Sequenciação dos produtos de PCR

A sequenciação realizou-se pelo método de Sanger, segundo o protocolo do "kit" de sequenciação "Sequenase version 2.0" (United States Biochemical Corporation). Preparou-se o DNA a sequenciar [pBluescript KS (+/-) contendo o "insert"] por Magic Mini-Preps de modo a ter 3 µg de DNA em 8 µl. Para a sua desnaturação, adicionaram-se 2 µl de NaOH 2 M e incubou-se 30 minutos, a 37 ° C. Seguiu-se a precipitação do DNA por adição de 3 µl de acetato de sódio 3 M, 7 µl de água, 60 µl de etanol absoluto arrefecido em gelo, deixando-se a -70° C, durante 15 minutos. Centrifugou-se 10 min a 12.000 g e lavou-se o sedimento com etanol a 70% arrefecido em gelo. O sedimento obtido foi seco e ressuspenso em 7 µl de água destilada. Para hibridação do "primer" ao molde de DNA adicionou-se 2 µl de tampão de reacção "sequenase reaction buffer" (200 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) e 1,5 µl de "primer" (1,2 ng/µl), incubando-se 20 min, a 37°C seguido de 10 min à temperatura ambiente. Usou-se como "primer" universal a sequência: 5'-AATACGACTCACTATAG-3' e como "primer" reverso a sequência 5'-AACAGCTATGACCATG-3'. Para a reacção de marcação, adicionou-se à mistura de hibridização do passo anterior 1 µl 0,1M DTT, 2 µl de mistura de marcação "labelling mix" (7,5 mM dGTP, 7,5 mM dCTP, 7,5 mM dTTP) diluída previamente a 1:5

com água destilada, 1 µl de [α - 35 S]dATP (10 µCi/ml) e 2 µl de Sequenase (13U/ml) diluída a 1:8 em tampão de diluição de enzima (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA). Misturou-se bem e deixou-se ocorrer a reacção à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Para as reacções de terminação marcaram-se 4 tubos A, T, G, e C. Adicionou-se 3,5 µl da mistura de marcação a cada tubo contendo 2,5 µl da mistura de terminação "termination mix" do respectivo ddNTP [ddG (80mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddGTP, 50 mM NaCl); ddA (80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddATP, 50 mM NaCl); ddT (80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddTTP, 50 mM NaCl); ddC (80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddCTP, 50 mM NaCl)] previamente aquecida a 37 °C (pelo menos durante 1 min). Depois de uma incubação a 37 °C, durante 5 min, terminou-se a reacção por adição a cada tubo de 4 µl de solução de terminação "stop solution" (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol FF). Após desnaturação a 90 °C, durante 3 min, aplicou-se 3,5 µl de cada amostra por poço, no gel de sequenciação. Utilizaram-se geles de sequenciação (0,4 mm) com gradiente composto por uma solução de 8% acrilamida/ureia "bottom" (30 ml de solução de 40% acrilamida, 100 ml 5xTBE, 92 g ureia, 20 g sacarose, 10 mg de azul de bromofenol) e por uma solução de 6% acrilamida/ureia "top" (75 ml de solução de 40% acrilamida, 50 ml 5x TBE, 230 g ureia em 500 ml de água). Aplicou-se uma corrente constante de 60 Watts em tampão 1x TBE. Utilizou-se a unidade "Sequencing Gel Electrophoresis System" modelo S2 da BRL (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.). Fixou-se o gel em solução de 15% metanol e 5% ácido acético, durante 30 min. O gel depois de seco a 80°C, ficou a expôr durante 18 a 24 hs, à temperatura ambiente.

3. Electroforese de RNA para "Northern Blot"

Para a electroforese lavou-se a tina e o pente com 0,1% SDS e depois com água tratada com DEPC para evitar a presença de RNAases.

O RNA total (de fígado e tecido decidual) foi separado em gel de agarose desnaturante constituído por glioxal/DMSO. Preparou-se um gel a 1,5% contendo 10 mM

Na₂HPO₄, pH 7. Fez-se a desnaturação das amostras (amostras de RNA e o DNA padrão λ cortado com *Hind*III desnaturado durante 5 min, a 65° C) em 0,8 M glioxal, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7 e 50% DMSO a 50 °C, durante 3 hs. Colocaram-se as amostras em gelo e adicionou-se 5 μ l de tampão de amostra (85% glicerol contendo 0,025% azul de bromofenol e 0,1% DEPC). Fez-se a electroforese a uma corrente de 80 volts, durante 2 a 3 hs (até a amostra ter percorrido 2/3 do gel) sendo o gel rodado de 30 em 30 min. Após a electroforese separaram-se as amostras do padrão. O DNA padrão foi lavado em 0,4 M NaOH durante 30 min, corado na mesma solução adicionada de 0,5 μ g/ml de brometo de etídio, durante 1 h e descorado com água. Fez-se a transferência das amostras de RNA para membrana de "nylon" (HybondN⁺, Amersham), em 20x SSC, durante a noite. Após a transferência, fez-se a fixação do RNA durante 2 hs, em estufa a 80°C. A pré-hibridização foi feita em solução de pré-hibridização (50% HCONH₂, 5x SET, 5x Denhardt's, 200 μ g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, 0,5% SDS, 2x "gel buffer") durante 1 a 2 hs, a 42 °C. Utilizou-se como sonda o "cocktail" de oligonucleótidos usado na reação de hibridização *in situ* do RNA codificante para o α 2M. Marcou-se a sonda e adicionou-se à solução de pré-hibridização, ficando a incubar durante a noite, a 42 °C. Fizeram-se as lavagens em 2x SSC contendo 0,1 %, à temperatura ambiente. Depois de secar a membrana de "nylon", procedeu-se à autoradiografia (Kodak) a -70 °C, durante 5 a 10 dias.

4. Purificação da DAP e AMF

4.1. Preparação de extractos de tecido decidual

No 12º dia de gravidez os ratos foram sacrificados por deslocação cervical e os úteros removidos para dissecção do tecido decidual. O tecido decidual foi homogeneizado 1:1 (p/v) com EDTA 0,05%, 1mM PMSF em "potter", a 4 °C. Após centrifugação a 100.000 g durante 60 min, a 4 °C, o sobrenadante obtido foi separado e utilizado para purificação da DAP.

Para se obterem extractos da DAP secretada para o meio de cultura, incubaram-se, em placas de cultura de 12 poços, pequenos fragmentos (100 mg/poço) de tecido decidual do 12º dia de gravidez em 3 ml de RPMI, a 37° C, atmosfera de 95% O₂ e 5 % CO₂, durante a noite. Recolheu-se o meio de cultura e centrifugou-se a 10.000 g durante 60 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi separado e utilizado para purificação da DAP.

4.2. Preparação do soro de fase aguda

O estado inflamatório foi induzido em ratos adultos (peso aproximado 250 g), por injeção de 1 ml de terebentina em óleo de amendoim (1:1, v/v) por via subcutânea na parte anterior e interior das coxas. Após um período de 48 hs colheu-se sangue por punção cardíaca. Obteve-se o soro por centrifugação do sangue a 2.000 g durante 10 min. Para obtenção de plasma o sangue foi colhido com heparina ou EDTA.

4.3. Cromatografia de troca iónica e filtração por gel

A DAP e AMF foram purificadas sucessivamente por cromatografia de troca iónica e filtração por gel como descrito por Teixeira e O'Grady (1992).

Ao plasma e soro de fase aguda adicionaram-se 1 M CaCl₂ (10:1, v/v) e sulfato de dextrano (concentração final de 0,2 %) para remoção de lipoproteínas de baixa densidade

(Okubo e col., 1981). O precipitado que se formou foi removido por centrifugação a 3.000 g, durante 20 min e o sobrenadante foi dialisado contra tampão de acetato 0,03 M, pH 5,1. Após diálise, este extracto (aproximadamente 20 ml) foi aplicado numa coluna (120 ml) de celulose-DEAE 52 (Watman) e eluido (15ml/h) com tampão 0,03 M acetato, pH 5,1, seguindo-se a eluição com um gradiente de 0,05 M a 0,2 M em tampão acetato. A leitura espectrofotométrica a 280 nm permitiu a selecção das fracções contendo proteínas. As fracções contendo AMF, cuja confirmação foi feita por PAGE nativo, foram dialisadas concentradas e aplicadas numa coluna (200 ml) de "Sephacryl S-300 HR" (Pharmacia) e eluidas (10 ml/h) com 0,04 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,03 M NaCl. Após PAGE nativa, as fracções contendo a AMF pura foram concentradas. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Os extractos deciduais obtidos por homogeneização do tecido decidual do 12º dia de gravidez foram, após diálise, aplicados numa coluna (120 ml) de celulose DEAE 52 (Watman) e eluidos com tampão 0,04 M Tris-HCl, pH 7,6, NaCl 0,03 M, seguido de um gradiente de sal (0,04 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,04 M NaCl a 0,04 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,2M NaCl). As fracções contendo DAP (após verificação por PAGE nativa) foram concentradas, aplicadas em coluna de "Sephacryl S300 HR" e eluidas com 0,04M Tris-HCl, pH 7,6, 0,03M NaCl. Concentraram-se as fracções contendo DAP pura e determinou-se a concentração proteica pelo método de Bradford. Em todos os passos a diálise foi realizada com mangas de diálise de "cut off" 30.000. A concentração da amostra foi realizada por ultrafiltração utilizando-se membranas ("cut off" 30.000) e aparelho de ultrafiltração da Sartorius. A electroforese foi realizada em PAGE nativo a 5% (ver condições em 7.4) e os geles foram corados com o nitrato de prata.

O meio de cultura do tecido decidual, contendo a DAP secretada, foi aplicado em coluna (200 ml) de "Sephacryl S 500 HR" (Pharmacia) tendo como tampão de eluição 0,04M Tris-HCl, pH 7,6, 0,03M NaCl. Concentraram-se as fracções contendo DAP e determinou-se a sua concentração tal como referido anteriormente.

5. Remoção do ácido siálico

Para a remoção do ácido siálico utilizou-se a neuraminidase isolada de *Clostridium perfringens*, com baixo teor de contaminação em proteases (Boehringer Mannheim). A enzima foi reconstituída com 0,2 M tampão de acetato, pH 5,5 (que também foi utilizado como tampão de incubação). Incubaram-se 6 µg de proteínas (AMF e DAP) com 0,2 U de neuraminidase durante 18 hs, a 37°C. O resultado da acção da neuraminidase sobre o ácido siálico foi avaliado por focagem isoeléctrica e PAGE nativo a 5% corado com o nitrato de prata (ver ponto 7.4).

6. Focagem isoeléctrica

A determinação dos pontos isoeléctricos das proteínas e das suas formas desglicosiladas foi realizada por focagem isoeléctrica no aparelho "Phast System" (Pharmacia, LKB). Utilizaram-se geles comerciais de poliacrilamida com anfólitos de pH de 4 a 6,5 (Pharmacia, LKB). Seguiram-se as condições de focagem aconselhadas no protocolo do manual do "Phast System" para geles de 4-6,5.

Usou-se como padrão de pontos isoeléctricos o "kit de calibração" da Pharmacia (vêr apêndice).

Os geles foram corados pela técnica de coloração pelo nitrato de prata segundo o protocolo do manual do "Phast System".

7. Ensaios com ligandos marcados radioactivamente

Para o estudo da ligação da IL-6 e do IGF-I às proteínas, DAP e AMF, utilizaram-se o meio de cultura de explantes de tecido decidual, homogeneizados de tecido decidual do 12º dia de gravidez, plasma de fase aguda e proteínas puras. Foram estudadas várias condições experimentais de ligação na presença e na ausência de protease (tripsina). Em

alguns casos a protease foi adicionada antes da adição do ligando (pré-incubação) e em outros casos realizou-se a adição em simultâneo às proteínas em estudo (co-incubação).

7.1. Incubação dos factores com os plasmas, extractos e proteínas purificadas

Realizou-se a incubação de ^{125}I -IL-6 (25 nM 40.000 cpm) ou ^{125}I -IGF-I (13 nM 40.000 cpm) (Amersham, Little Chalfont, U.K.) durante 2 hs, a 37 °C, com: 10 μl de plasma de rato normal ou plasma de fase aguda, 60 μl de homogeneizados ou de meios de cultura proveniente das incubações de tecido decidual *in vitro*, fracções obtidas durante os passos de purificação ou 0,4 μM de DAP e AMF purificadas. Usou-se PBS, pH 7,4, 0,2% BSA como tampão de incubação, sendo o volume final da mistura de incubação de 100 μl . Conforme os casos na mistura de incubação incluiu-se a tripsina e o inibidor da tripsina.

7.1.1. Pré-incubação com tripsina

A conversão das proteínas na forma "fast" foi obtida por pré-incubação com tripsina [4 μM no caso de extractos ou plasmas e 0,4 μM no caso de proteínas puras, (concentrações de enzima activa)] durante 30 min, a 37°C, seguindo-se uma incubação adicional de 1 h com o inibidor da tripsina de soja, numa concentração final de 100 μM . As amostras foram então incubadas com o factor marcado tal como descrito em 7.1. A concentração de tripsina activa nas preparações comerciais (Sigma) foi determinada por titulação do local activo com o *p*-nitrofenil *p*-guanidinobenzoato (Chase e Shaw, 1967).

7.1.2. Co-incubação com tripsina

Em experiências de co-incubação, a tripsina activa estava presente durante a incubação com os factores marcados. Em alguns casos o inibidor da tripsina de soja, em concentração final de 100 μM , estava incluído na mistura de incubação. Realizou-se a

incubação simultânea de ^{125}I -IL-6 (25 nM, 40.000 cpm) ou ^{125}I -IGF-I (13 nM, 40.000 cpm) com os plasmas, os extractos decíduais, as fracções obtidas durante os passos de purificação ou a DAP e AMF purificadas e a tripsina nas concentrações indicadas (7.1.1.).

7.2. Deslocamento da ligação

Para determinar a afinidade da ligação das proteínas aos ligandos realizou-se quer no caso da IL-6, quer no caso do IGF-I, a adição, em concentrações crescentes, dos factores não marcados radioactivamente.

No caso da IL-6, incubaram-se as proteínas puras (quer a DAP, quer a AMF) na concentração de 0,4 μM , durante 2 hs a 37°C, com ^{125}I -IL-6 e com quantidades crescentes de IL-6 (25 nM, 50 nM, 0,5 μM , 2,5 μM , 5 μM e 12,5 μM) não marcada radioactivamente.

No caso do IGF-I, e porque a ligação ocorria essencialmente na presença da tripsina, o estudo realizou-se também em condições de co-incubação com esta enzima. Assim, incubaram-se as proteínas puras numa concentração de 0,4 μM durante 2 hs a 37°C, com ^{125}I -IGF-I e com concentrações crescentes de IGF-I (13 nM, 65 nM, 0,3 μM , 0,65 μM e 1,3 μM) não marcado radioactivamente. Noutra experiência, incubaram-se as proteínas puras (0,4 μM) com 0,4 μM de tripsina, ^{125}I -IGF-I e as mesmas concentrações crescentes de IGF-I não marcado radioactivamente, durante 2 hs a 37°C.

Para o IGF-I o deslocamento da ligação foi quantificado, após excisão das bandas coradas dos geles, pela medição em contador γ (Beckman), da radioactividade incorporada nas bandas.

7.3. Avaliação da ligação covalente

Para demonstração da ligação covalente usaram-se geles de SDS-PAGE, com gradiente de 4 a 17%, com ou sem β -mercaptoetanol (ver 7.4). A detecção do [^{125}I] foi feita por autoradiografia.

7.4. Sistema de electroforese e autoradiografia

Em todas as preparações a presença dos componentes ligados foi estudada por electroforese em geles de PAGE com gradiente de 4 a 17%, (nativos, com SDS ou com SDS/ β -mercaptoetanol) ou geles a 5%. O sistema de tampões usado foi o de Laemmli (1970). O tampão de corrida foi uma solução de 1,5 M Tris, pH 8,8 (com 0,1% SDS, quando necessário) e o tampão de eléctrodos foi uma solução de 0,025 M Tris, pH 8,3, 0,192 M glicina (com 0,1% SDS, quando necessário). As amostras foram misturadas na proporção de 1:1 com tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol), contendo ou não 4% SDS com ou sem 10% β -mercaptoetanol. Os geles foram corados pelo Azul de Coomassie. Foram usados marcadores de peso molecular da Bio Rad (ver apêndice). Foram utilizadas tinas de electroforese da Pharmacia-LKB. Para a autoradiografia e detecção do [125 I], utilizou-se o filme "Fuji Medical X-Ray Film" e realizaram-se exposições a -70°C que variaram de 24hs a 3 dias.

8. "Western Blot"

As amostras provenientes de vários passos de purificação foram aplicadas em gel de poliacrilamida não desnaturante a 5 %. Após electroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C 0,45 μm , Amersham) por "electroblotting", em aparelho de "transblot" (Biorad) a 25 V, durante 20 hs, a 4°C , em tampão de transferência (0,25 M Tris, 1,9 M Glicina, pH 8,3). Após a transferência lavou-se a membrana com TBS. As proteínas transferidas foram detectadas com uma solução corante de 0,2% Ponceau S em 3% TCA. Após descoloração em TBS-Tween, a membrana foi incubada à temperatura ambiente numa solução de TBS-Tween contendo 5% de leite em pó magro, durante 30 min. Depois da lavagem em TBS-Tween, o antigénio nas membranas foi detectado, por incubação durante 2 hs, à temperatura ambiente, com antisoro policlonal para DAP (que também reage com a $\alpha 2\text{M}$ circulante), na diluição 1:400 em TBS-Tween (v/v). Após incubação, realizaram-se 3 lavagens de 10

min cada com TBS-Tween. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 h com uma Ig de cabra anti-coelho, marcada com a peroxidase (Sigma), numa diluição de 1:100 em TBS-Tween (v/v). Seguiram-se 3 lavagens de 10 min cada com TBS-Tween, duas lavagens com água e finalmente uma lavagem rápida com 50 mM Tris-base, pH 7,4. Para detectar a actividade da peroxidase adicionou-se o substrato 4-cloro-1-naftol na presença de H₂O₂ (ver preparação no apêndice), com agitação durante 5-15 min até ao aparecimento de cor púrpura. Terminou-se a reacção lavando com água destilada.

9. Hibridização *In Situ*

9.1. Preparação de cortes histológicos em parafina

Para a preparação de cortes histológicos em parafina utilizaram-se vários órgãos: os úteros de animais grávidos dos dias 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, o fígado fetal, o fígado de animais adultos e os úteros de animais não grávidos. Para a visualização do local de implantação nos 6º e 7º dias de gravidez injectou-se, 15 minutos antes de os animais serem sacrificados, o corante "Pontamine Sky Blue" a 1% em soro fisiológico (p/v) na veia lateral da cauda (Psychoyos, 1960). Os animais foram sacrificados por deslocação cervical e os órgãos foram imediatamente dissecados "post-mortem" e fixados em formol a 10% em tampão de fosfatos, pH 7,4. Seguiu-se o processo de desidratação em álcoois de graduação progressiva (ver apêndice) e a inclusão em parafina. O bloco foi orientado de modo a que os locais de implantação fossem seccionados longitudinalmente ou transversalmente. Fizeram-se blocos em triplicado (3 animais diferentes). Realizaram-se cortes seriados (4 µm) para se obter nos locais de implantação, precisamente, a área a ser estudada. Os cortes foram estendidos em banho a 45° C e recolhidos em lâminas revestidas com aminoalquilsilano (vêr apêndice). Verificou-se que sem esta solução adesiva, os cortes se descolavam durante a reacção de hibridização *in situ*. O estudo geral da morfologia foi realizado corando a última lâmina de cada série de 10 com hematoxilina /eosina.

9.2. Sondas de oligonucleótidos

Para o estudo da localização do mRNA codificante para a DAP, as sondas foram desenhadas para hibridarem com o mRNA da $\alpha 2M$ de forma a evitar as zonas de homologia entre os membros da família das α -macroglobulinas. Por isso, foram dirigidas para hibridar com 3 porções do transcrito correspondente à "bait region". Para o estudo da localização dos mRNAs codificantes para os IGF-I e IGF-II, foram desenhadas sondas complementares a várias zonas desses mRNAs de modo a possuírem o máximo de especificidade.

Os oligonucleotidos foram sintetizados no "Applied Biosystems Inc DNA synthesizer", Departamento de Bioquímica, Universidade de Leicester.

As sondas para hibridização com o mRNA codificante para a $\alpha 2M$ foram:

5'-GCA CTG GCG AGT ACA GGA TTC CAT TAA TGT-3';

5'-GAC TTT GGG TTT ACG GAT GTT CGA GTT GGT-3';

5'-GGA GAC TCT GAA GAC TCT AGA AAA GCG TCC-3'.

As sondas para hibridização com o mRNA codificante para o IGF-I foram:

5'-TCT GGT CCG GCT GTG GCC GAG CTG GTA AAG-3'

5'-CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCG TCC ACC AGC-3'

5'-GTG GTG CCC TCC GAA TGC TGG AGC CAT AGC-3'

5'-CTG GGC CCG GAT GGA ACG AGC TGA CTT TGT-3'

5'-CAA GCA GCA AAG GAT CTT GCG GTG ACG TGG-3'

5'-TGG CAG GTG TTC CGA TGT TTT GCA GGT TGC-3'

As sondas para hibridização com o mRNA codificante para o IGF-II foram:

5' CAA CAT CGA CTT CCC CAC TGG GAT CCC CAT 3'

5' CAG AGT CTC GCT GGG GCG GTA AGC AGC GAT 3'

5' CTC TCG GAC TTG GCG GGG GTG GCA CAG TAT 3'

5' ACG CTT CGA GCT CTT TGG CAA GCA TGC GAC 3'

5' TGG GCG GGG TCT TTG GGT GGT AAC ACG ATC 3'

5' GAG TTG CTG GGA TCC CCT TGC CCG ATG GTG 3'

9.3. Marcação das sondas com a digoxigenina

Os oligonucleótidos foram marcados na extremidade 3' com a digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) por acção da desoxinucleotidil terminal transferase-TdT (Boehringer Mannheim). A marcação foi executada em "cocktails" de oligonucleótidos (3 para a DAP e 6 para o IGF-I e II).

Para a reacção de marcação a razão nanomolar DNA:digoxigenina-11-dUTP foi de 1:25 e a concentração de desoxinucleotidil terminal transferase foi de 5 U por μg de DNA. Para a marcação de 5 μg de DNA, adicionaram-se 10 μl de 10 mM MnCl_2 , 12 μl de 0.4 mM digoxigenina-11-dUTP, 1 μl de TdT (25 U), 20 μl de tampão de enzima (fornecido com a enzima) e água destilada até completar um volume de reacção de 100 μl . A reacção decorreu, durante 2 hs, a 37 °C. Para terminar a reacção adicionaram-se 5 μl de 0,5 M EDTA, pH 8,0.

Após marcação, realizou-se uma cromatografia de exclusão em coluna de "Sephadex G50" (Pharmacia) usando TE como tampão de eluição, segundo o processo descrito por Sambrook e col., (1989). Determinou-se a concentração do DNA eluído da coluna assumindo-se que a absorvância a 260 nm de uma solução a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA seria de 1 unidade.

9.4. Eficiência de marcação

Preparou-se uma solução diluente constituída por 300 μl de 20xSSC, 20 μl de esperma de salmão desnaturado (10 mg/ml) e 680 μl de água. Diluiu-se a sonda com a solução de diluição de modo a obter concentrações decrescentes de sonda contendo 1 ng/ μl , 100 pg/ μl , 50 pg/ μl , 10 pg/ μl , 1 pg/ μl . Aplicou-se numa tira de nitrocelulose (Hybond C, Amersham) 1 μl de cada diluição, bem como 1 μl de solução diluente (como controlo negativo). Fixou-se a membrana a 80°C, durante 2 hs. Mergulhou-se em solução bloqueadora TBS contendo BSA 3% (p/v) e Triton X-100 0,1% (v/v) a 37°C, durante 20 min e aqueceu-se de novo a 80°C, durante 20 min. Transferiu-se para a solução bloqueadora à temperatura ambiente durante 10 min e cobriu-se a tira com anticorpo anti-

digoxigenina (Boehringer Mannheim) contendo acoplado a fosfatase alcalina, numa diluição de 1: 600 em solução bloqueadora, durante 30 min, à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana duas vezes com água destilada e mergulhou-se no tampão do substrato (ver apêndice) durante 5 min. Adicionou-se o reagente NBT/BCIP (ver apêndice) e deixou-se decorrer a reacção de coloração ao abrigo da luz, durante 2 hs. Parou-se a reacção com a adição de água destilada. As manchas de cor púrpura devem visualizar-se pelo menos até à diluição de 50 pg/ μ l.

9.5. Reacção de hibridização

Iniciou-se a reacção de hibridização por desparafinação dos cortes em xilol (2x5 min) e hidratação, sucessivamente em etanol absoluto (2x2 min), etanol 95% (2 min) e água tratada com DEPC (2 min). Os cortes, após imersão em 2xSSC a 70°C, durante 10 min, foram sujeitos a digestão com proteinase K (concentrações variando de 5 a 15 μ g/ml em Tris 0,05M/DEPC, pH 7.6), a 37° C, durante 1 h. O tratamento dos cortes com proteinase K permite aumentar a acessibilidade da sonda por digestão das proteínas que rodeiam o ácido nucleico alvo. Seguiram-se duas lavagens com água destilada tratada com DEPC, a 4° C, durante 5 min e uma fixação em 0,4% paraformaldeído em tampão de fosfatos (0,1M PBS/DEPC) a 4° C, durante 20 min. Após lavagem com água destilada tratada com DEPC (2x 5 min), os cortes foram incubados com solução de pré-hibridização (ver apêndice), durante 1h, a 37° C. Após a eliminação da solução de pré-hibridização os cortes foram incubados a 37° C, durante a noite, em câmara húmida com a solução de hibridização (mesma composição da solução de pré-hibridização) contendo a sonda de DNA marcada (ver 9.3) na concentração de 0,5-1 μ g/ml. Os cortes foram cobertos com lamelas siliconizadas durante este período. Depois da hibridização, fizeram-se 2 lavagens com 2x SSC/30% formamida (v/v), a 37°C, durante 10 min, seguidas por uma lavagem com solução bloqueadora em TBS contendo 3% BSA (p/v) e 0,1% Triton X-100 (v/v), à temperatura ambiente, durante 5 min. Para a detecção da sonda os cortes foram incubados durante 30 min com um anticorpo anti-digoxigenina (Boehringer Mannheim), conjugado com a enzima fosfatase alcalina, numa diluição de 1:600 em

solução bloqueadora e posteriormente lavados com tampão TBS (2x 5 min) e tampão de substrato (ver apêndice). A actividade da fosfatase alcalina foi demonstrada aplicando 200 µl em cada corte de uma mistura do cromogénio "nitroblue tetrazolium" (NBT), do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e de levamisol (ver apêndice). O levamisol funcionou como inibidor da actividade da fosfatase alcalina endógena. O tempo de reacção foi monitorizado microscopicamente por observação da formação de um precipitado de cor púrpura. A reacção decorreu ao abrigo da luz, durante a noite e foi terminada por lavagem com água da torneira corrente durante 5 min. As lâminas foram montadas em meio de Apathy's (BDH). Realizaram-se controlos negativos onde a sonda não foi adicionada no passo de hibridização. Para ter a certeza que as sondas estavam a hibridar somente com o RNA realizou-se uma digestão com RNAase A (50 µg/ml), antes da fixação com paraformaldeído. Usaram-se ainda como controlos, tecidos que se sabia serem negativos para o RNA pesquisado (pâncreas para o mRNA da DAP) ou positivos (fígado fetal para os mRNAs da DAP e IGF-II e fígado adulto para o mRNA do IGF-I).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Comparação das sequências de DNA correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF

Como foi referido no capítulo de Introdução a família das α -macroglobulinas engloba proteínas com um alto grau de homologia, apresentando, no entanto, uma região com uma sequência e número de aminoácidos diferente, designada por "bait region". Com base neste facto, realizámos estudos em zonas restrictas das sequências de DNA correspondentes às "bait regions" da AMF e da DAP, de modo a tentar esclarecer possíveis homologias existentes entre as duas proteínas.

Na presença dos "primers" "sense" e "antisense", desenhados a partir de zonas homólogas de DNA obtidas pelo alinhamento dos cDNAs das α 2M de rato e humana, fez-se a amplificação das duas zonas de DNA correspondentes às "bait regions" da DAP e AMF. A sequência de cDNA da α 2M (Fig. 9) contém a zona amplificada assinalada. Os produtos obtidos da reacção do PCR foram separados em gel de agarose a 3%. Verificou-se que nos dois DNAs os produtos do PCR obtidos apresentavam um tamanho igual, com cerca de 350 bp (Fig. 8).

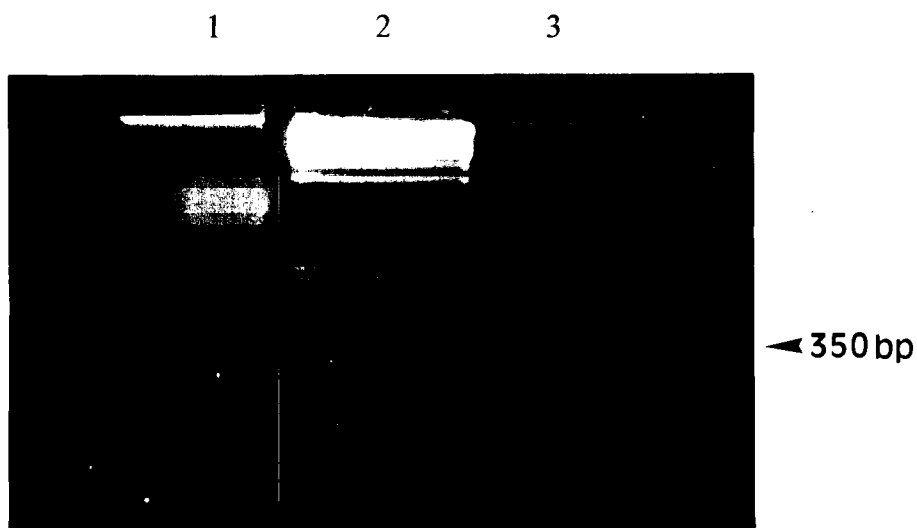


Figura 8- "PCR" do DNA correspondente às zonas da "bait region" da DAP e AMF em gel de agarose a 3%. Os produtos de PCR obtidos mostram a presença de um fragmento com cerca de 350 bp; 1- DNA correspondente à amplificação da zona da "bait region" da AMF; 2- λ -PvuII; 3- DNA correspondente à amplificação da zona da "bait region" da DAP.

Como os produtos do PCR correspondentes às "bait regions" não apresentaram diferenças de tamanho, que poderiam ser indicativas de diferenças nas zonas de DNA que codificam para as "bait regions" da DAP e AMF, foi necessário sequenciar o fragmento correspondente à "bait region" da DAP. A sequenciação foi feita após clonagem no fagemídeo pBluescript KS (+/-), à qual se seguiu o isolamento do DNA recombinante. Verificou-se por digestão enzimática, com várias enzimas de restrição, a presença ou não do "insert". Na digestão com *EcoRV* e *HindIII*, os transformantes I (Figs.10 e 11, linha 4), III (Figs. 10 e 11, linha 6), VIII (Figs. 10 e 11, linha 11) e X (Figs.10 e 11, linha 13) apresentaram uma banda com maior peso que os restantes.

Para confirmar os resultados desta digestão fez-se uma digestão dupla com *Hind III* e *BamHI* (Fig. 11A) para a libertação do "insert" dos transformantes I, III, VIII e X.

A identidade destes "inserts" foi determinada por "Southern blot" utilizando como sonda a banda de DNA amplificada por PCR. Esta análise confirmou que a banda utilizada como sonda foi clonada dado que se verificou a hibridação dos "inserts" com o produto do PCR (Fig. 12B).

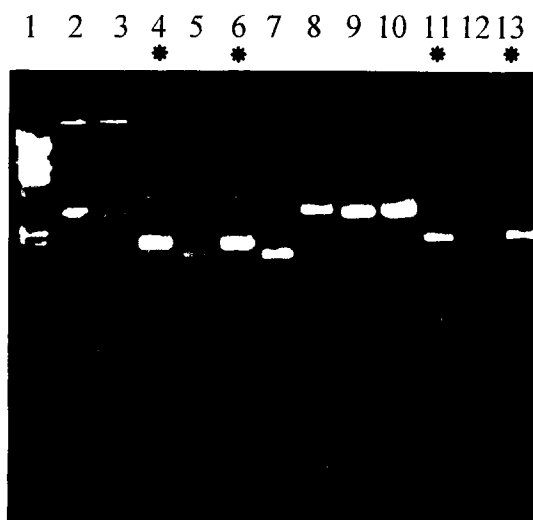


Figura 10- DNA dos clones pBluescript KS (+/-) digeridos com a *EcoRV*, e separados por electroforese em gel de agarose a 1%. Os transformantes I, III, VIII, X apresentam banda com maior peso (*) que os outros transformantes. 1- λ -*HindIII*; 2- pKS nativo; 3- pKS digerido com *EcoRV*; 4- transformante I; 5- transformante II; 6- transformante III; 7- transformante IV; 8- pKS extraído das colónias azuis; 9 e 10- pKS adicionado de dTTP por PCR; 11- transformante VIII; 12- transformante IX; 13- transformante X.

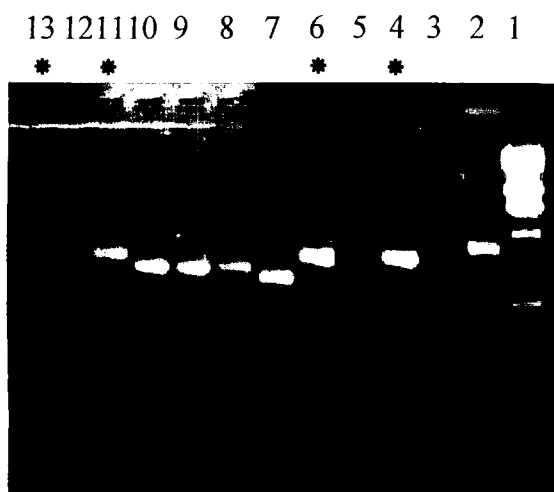


Figura 11- DNA dos clones pBluescript KS (+/-) digeridos com *Hind*III e separados por electroforese em gel de agarose a 1,2%. Os transformantes I, III, VIII, X apresentam banda com maior peso (*) que os outros transformantes. 1- λ -*Hind*III; 2- pKS nativo; 3- pKS digerido com *Hind*III; 4- transformante I; 5- transformante II; 6- transformante III; 7- transformante IV; 8- pKS extraído das colónias azuis; 9 e 10-pKS adicionado de dTTP por PCR; 11- transformante VIII; 12- transformante IX; 13- transformante X.

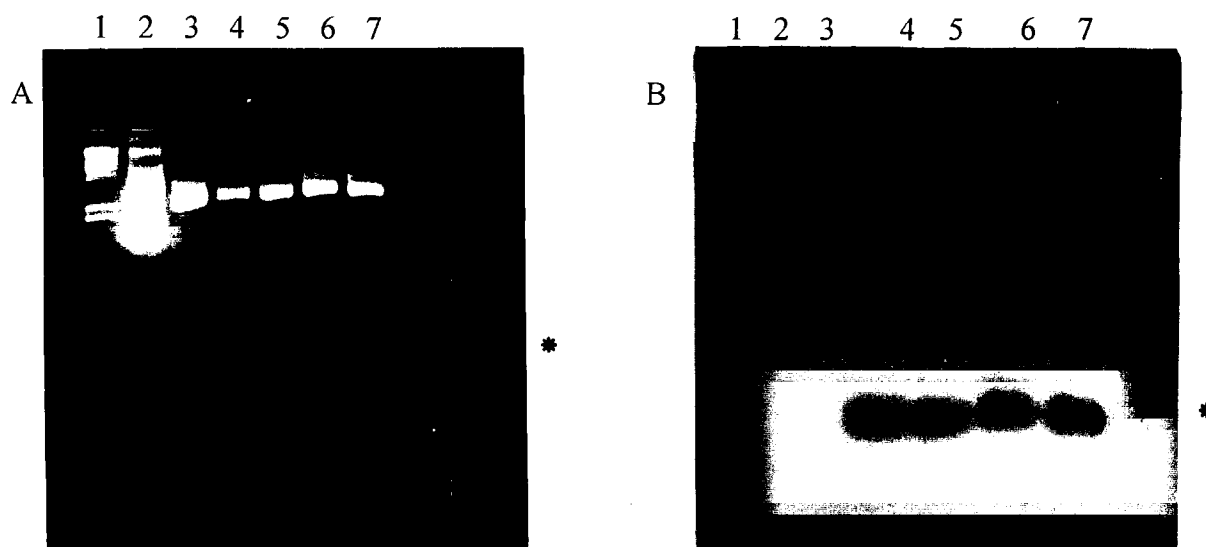


Figura 12- (A)- DNA dos clones pBluescript KS (+/-) digeridos com *Hind*III e *Bam*HI e separados por electroforese em gel de agarose a 1,5%. 1- λ -*Hind*III; 2- pKS nativo; 3- pKS com digestão dupla *Hind*III e *Bam*HI; 4, 5, 6 e 7- Os transformantes I, III, VIII e X libertaram o "insert" (*). **(B)-** "Southern blot" do gel apresentado em (A) contendo os "inserts" após digestão com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI e hibridização com o DNA do produto de PCR marcado radioactivamente com α [32 P] dCTP.

O DNA dos clones I, III, VIII e X foi purificado para sequenciação. A sequência dos ácidos nucleicos foi determinada e estes clones permitiram a leitura de 347 nucleótidos. Por comparação desta sequência de 347 nucleótidos, correspondente à zona da “bait region” da DAP, com a sequência da AMF já determinada (Gehring e col., 1987; Fig.9) verificou-se haver total identidade entre elas, ou seja entre os nucleotídeos 1966 e 2276 (Fig.9) que correspondem ao DNA amplificado por PCR a partir dos “primers” sense e antisense.

2. Comparação qualitativa do conteúdo em ácido siálico da DAP e AMF

Para a identificação das possíveis diferenças na estrutura glucídica da AMF e da DAP, realizou-se uma digestão com neuraminidase. As proteínas na sua forma nativa e as parcialmente desglicosiladas por acção da neuraminidase foram submetidas a análise electroforética em PAGE nativo a 5%.

Com este sistema foi possível observarem-se diferentes mobilidades electroforéticas entre a AMF e as formas intracelular e secretada da DAP (Fig. 13). A AMF na sua forma nativa apresenta uma mobilidade electroforética ligeiramente superior à forma extracelular da DAP, a qual por sua vez, apresenta mobilidade electroforética ligeiramente superior à DAP na sua forma intracelular. A digestão do ácido siálico por acção da neuraminidase demonstrou que as proteínas após digestão possuíam mobilidades electroforéticas muito semelhantes e próximas da mobilidade da DAP na sua forma intracelular (Fig. 13).

A focagem isoeléctrica das preparações das proteínas nas suas formas nativas e digeridas permitiu obter um pI de 4,85 para a AMF, de 5,2 para a forma intracelular da DAP, de 5,0 para a forma extracelular e 5,2 para as formas digeridas (Fig. 14). Após digestão, os pIs das formas digeridas eram muito semelhantes entre si e idênticos ao pI da DAP na forma intracelular. Estes resultados poderão explicar os obtidos por PAGE.

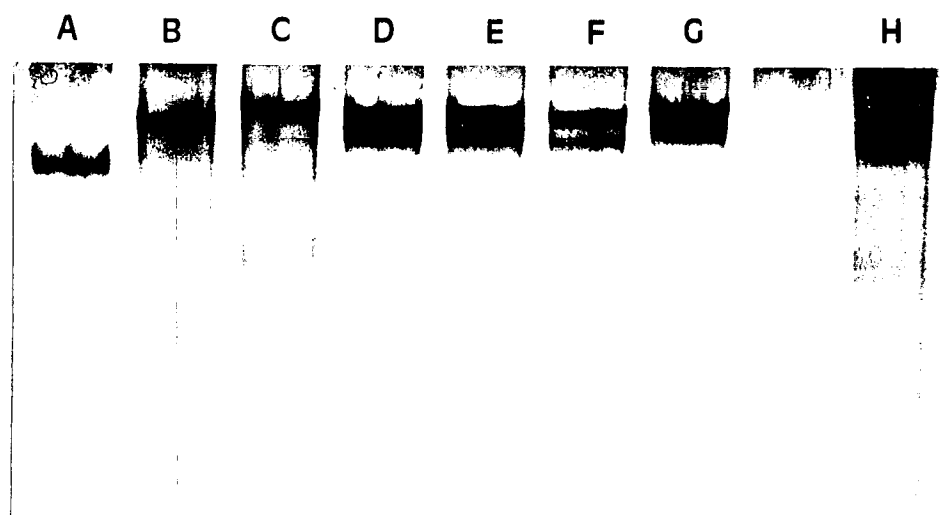


Figura 13- Gel de PAGE nativo a 5% corado com nitrato de prata demonstrando as formas nativas das proteínas e as suas formas digeridas com neuraminidase. (A)- α 2M humana; (B)- AMF; (C)- AMF digerida com neuraminidase; (D)- DAP forma intracelular; (E)- DAP forma intracelular digerida com neuraminidase (F)- DAP forma secretada; (G)- DAP forma secretada digerida com neuraminidase; (H)- Extracto decidual do dia 12 de gravidez.

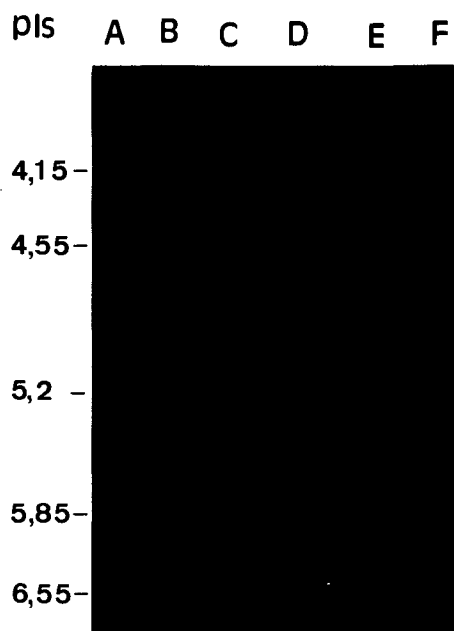


Figura 14- Focagem isoelectrica em gel de pH 4-6,5 corado com nitrato de prata demonstrando as formas nativas das proteínas e as suas formas digeridas com neuraminidase.

(A)- AMF; (B)-AMF digerida com neuraminidase;
 (C)- DAP forma intracelular; (D)- DAP forma intracelular digerida com neuraminidase (E)- DAP forma secretada; (F)- DAP forma secretada digerida com neuraminidase.

3. Ensaaios com ligandos marcados radioactivamente

A interleuquina-6 (IL-6) é uma citocina sintetizada durante a gravidez em vários tecidos, nomeadamente na decidua e na placenta, e é responsável pela estimulação da síntese de α_2M nos hepatócitos. Por outro lado, a IL-6 é também um ligando da α_2M humana (Matsuda e col., 1989). Deste modo, iniciámos o estudo de ligação da DAP/AMF a ligandos, verificando se as duas formas de α_2M do Rato exibiam estas propriedades de ligação à IL-6. Posteriormente, realizou-se o estudo da possível ligação com o IGF-I dado que no Homem a principal proteína sintetizada pela decidua é uma proteína que liga o IGF-I, a IGFBP-1. Em ambos os casos testamos as várias possibilidades de ligação dos ligandos marcados radioactivamente com [^{125}I], usando-se como protease a tripsina. A tripsina ou não era incluída na preparação, ou era adicionada antes do ligando radioactivo (pré-incubação), ou era adicionada simultaneamente com o ligando radioactivo (co-incubação).

A AMF foi purificada a partir de plasma de fase-aguda. A DAP foi purificada a partir de homogeneizados de tecidos decíduais (forma intracelular) e de meio de incubação de explantes de tecidos decíduais (forma secretada). Quer as proteínas purificadas quer os extractos totais e plasmas de fase-aguda foram incubados com o ligando radioactivo segundo as condições já descritas anteriormente (Métodos). A pré-incubação e co-incubação das proteínas com a tripsina resultou na sua conversão em formas de maior mobilidade electroforética, as formas "fast".

Por incubação dos extractos totais, da DAP intracelular e secretada, do plasma de fase aguda e da AMF purificada do plasma, nas várias condições de reacção já referidas, verificou-se que a ligação da [^{125}I]-IL-6 e do [^{125}I]-IGF-I era restricta a um componente de elevado peso molecular com mobilidade idêntica à da AMF e DAP como foi demonstrado em PAGE 4-17% (Figs. 15 e 16).

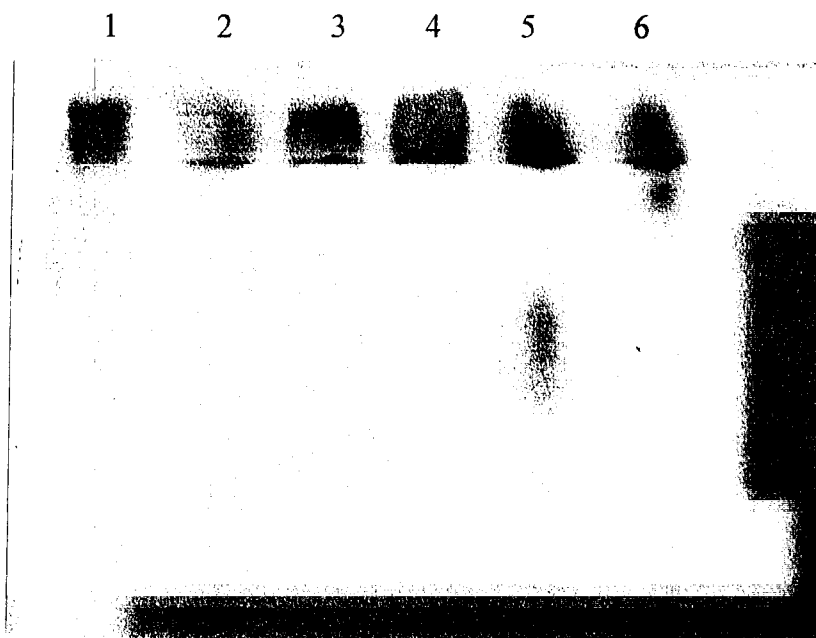


Figura 15- Autoradiografia de um gel PAGE nativo a 4-17% contendo várias preparações incubadas com $[^{125}\text{I}]\text{-IL-6}$. 1- $[^{125}\text{I}]\text{-IL-6}$; 2- extracto citosólico de tecido decidual do 12º dia de gravidez; 3- DAP; 4- AMF; 5- plasma de fase aguda; 6- meio de incubação de tecido decidual do 12º dia de gravidez.

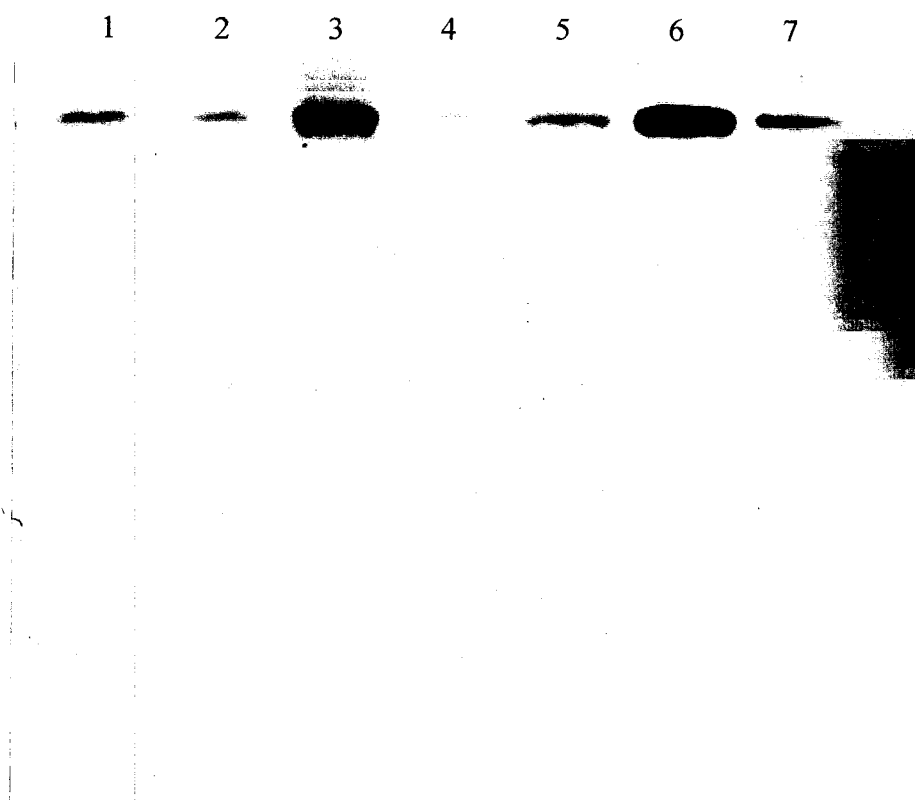


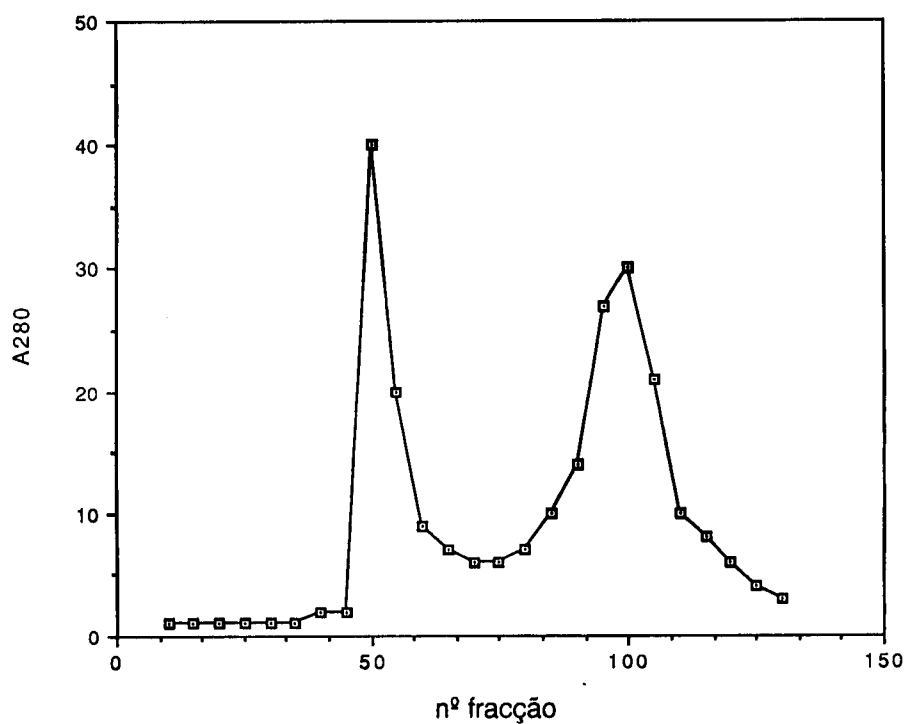
Figura 16- Autoradiografia de um gel nativo 4-17% PAGE demonstrando a ligação de IGF-I ao componente de elevado peso molecular no plasma de fase aguda. $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ (13 nM) foi incubado com: 1- plasma de fase aguda; 2- plasma de fase aguda pré-incubado com tripsina; 3- plasma de fase aguda co-incubado com tripsina; 4- AMF purificada; 5- AMF pré-incubada com tripsina; 6- AMF co-incubada com tripsina; 7- AMF co-incubada com tripsina e inibidor da tripsina.

Para confirmar que os componentes que ligavam a [125 I]-IL-6 e o [125 I]-IGF-I, detectados nos extractos decíduais totais e no plasma de fase aguda, representavam a AMF e a DAP, submetem-se estas preparações a processos de purificação. A ligação aos ligandos radioactivos foi pesquisada por autoradiografia e a imunoreactividade das proteínas por "western blotting" com um anticorpo policlonal anti-DAP, que também reagia com a AMF (Figs 17 e 18). Os extractos do meio de incubação de tecido decidual do dia 12 de gravidez foram fraccionados em coluna de Sephacryl S500 e as fracções contendo proteínas foram incubadas com [125 I]-IL-6 (Fig. 17) e [125 I]-IGF-I. Verificou-se, para a IL-6, que a presença do ligando marcado estava sempre associada a fracções contendo um componente de elevado peso molecular que possuía uma posição de migração em PAGE idêntica à DAP purificada. Quando as mesmas amostras foram incubadas com [125 I]-IGF-I a ligação ocorria nas mesmas fracções e também com o componente de elevado peso molecular, mas só quando a tripsina estava presente na mistura de incubação. O componente de elevado peso molecular para além de migrar em PAGE, numa posição idêntica à DAP/AMF era imunoreactivo com o anticorpo policlonal anti-DAP/AMF.

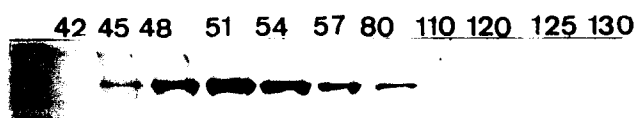
Durante a purificação da AMF do plasma de fase aguda, a cromatografia de troca iónica em DEAE 52 revelou que, na presença de tripsina, para além da ligação à AMF, o [125 I]-IGF-I se ligava a um segundo componente de elevado peso molecular com mobilidade electroforética ligeiramente maior e que poderá ser o α 1M (Fig. 18B). Foram também detectados outros componentes de baixo peso molecular que ligam [125 I]-IGF-I e que estão presentes nas fracções 35 e 40 (Fig. 18B).

Para estudar as características da ligação da [125 I]-IL-6 e do [125 I]-IGF-I testou-se o efeito que a tripsina exercia na ligação e qual a influência da sua concentração. Realizou-se a incubação das proteínas purificadas com a enzima antes da adição do ligando (pré-incubação), ou por adição simultânea da enzima ao factor (co-incubação). Nas reacções de incubação usaram-se razões molares de 1:1 e 1:2 de proteínas:tripsina activa. Observou-se que a [125 I]-IL-6 formava complexos com idêntica capacidade de ligação quer com a forma "slow" das proteínas quer com a forma "fast", resultante da acção da tripsina (Fig. 19). A ligação não era dependente da presença de enzima e ocorria também com as proteínas na forma nativa. Além disso, observou-se que tanto a DAP como a AMF ligavam a IL-6 com a mesma intensidade, não parecendo existir nestas experiências diferenças funcionais, em relação à capacidade de ligação, entre as duas proteínas.

A



B



C

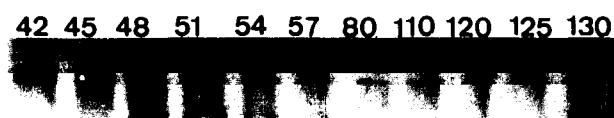


Figura 17- Extractos totais de meio de incubação de tecido decidual do 12º dia foram fraccionados em "Sephacryl S 500 HR", tampão PBS, pH 7,4. Foram colectadas fracções de 3 ml. (A)- Perfil de eluição; (B)- As fracções foram submetidas a electroforese em PAGE nativo 4-17% e o gel foi corado com azul de Coomassie; (C)- Autoradiografia das mesmas fracções incubadas com [¹²⁵I]-IL-6.

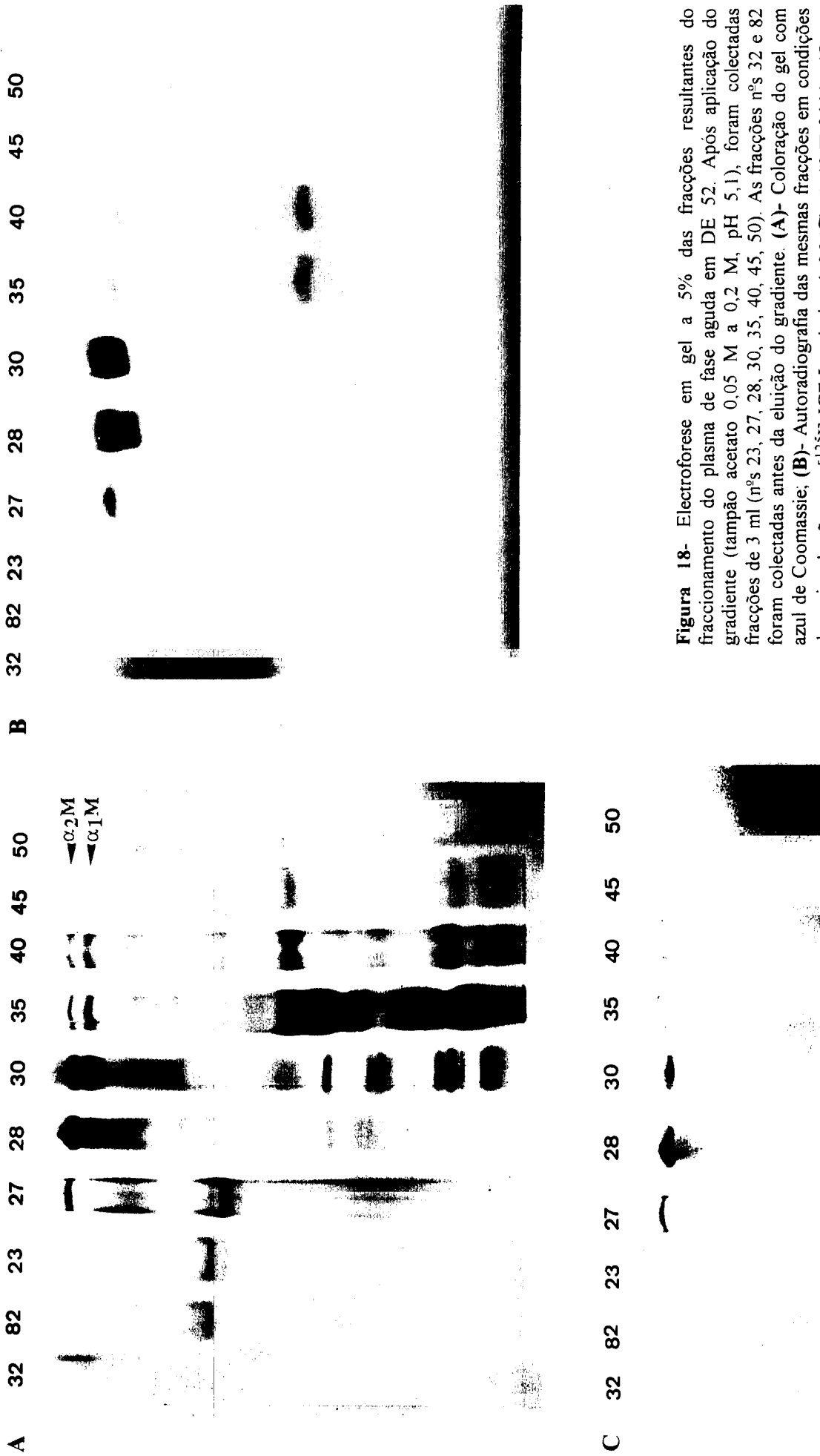


Figura 18- Electroforese em gel a 5% das fracções resultantes do fraccionamento do plasma de fase aguda em DE 52. Após aplicação do gradiente (tampão acetato 0,05 M a 0,2 M, pH 5,1), foram colectadas fracções de 3 ml (n^os 23, 27, 28, 30, 35, 40, 45, 50). As fracções n^os 32 e 82 foram colectadas antes da eluição do gradiente. (A)- Coloração do gel com azul de Coomassie; (B)- Autoradiografia das mesmas fracções em condições de co-incubação com $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ e tripsina 4 μM (C)- A AMF foi identificada por "western blotting" com um anticorpo policlonal anti-DAP.

Pelo contrário, em todas as preparações estudadas, a ligação do [125 I]-IGF-I era fundamentalmente dependente da co-incubação com a enzima. A presença do inibidor da tripsina de soja na mistura de incubação, provocou a inibição da conversão da forma "slow" na forma "fast" e um marcado decréscimo na ligação do ligando (Fig.20).

A ligação do [125 I]-IGF-I à DAP ou AMF era essencialmente dependente da presença de tripsina na mistura de incubação, isto é, os complexos [125 I]-IGF-I-DAP ou AMF eram formados em condições de co-incubação durante a transformação da forma "slow" em "fast" por acção da tripsina. A forma "fast" gerada em presença de IGF-I, ligava uma maior quantidade de [125 I]-IGF-I que a forma "slow" ou a forma "fast" pré-formada (Fig 20B). Por outro lado, verificou-se que a ligação era nitidamente favorecida na razão 1:1 (complexos binários) quando comparada com a razão 1:2 (complexos ternários) (Fig. 21).

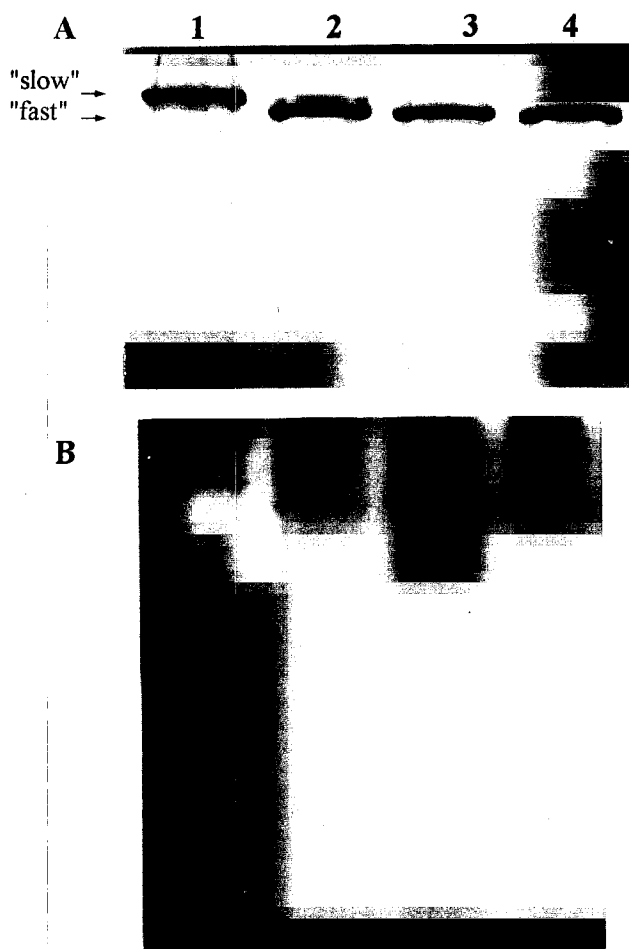


Figura 19- Formação do complexo da [125 I]-IL-6 com a forma "slow" e a forma "fast" da DAP. Preparações de DAP purificada foram incubadas com [125 I]-IL-6 e submetidas a 4-17% PAGE e autoradiografia. As concentrações de DAP e tripsina usadas foram $0,4\mu\text{M}$. **1-** DAP; **2-** DAP pré-incubada com tripsina; **3-** DAP co-incubada com tripsina na razão 1:1; **4-** DAP co-incubada com tripsina na razão 1:2 (DAP:tripsina). **(A)**- Coloração com azul de Coomassie; **(B)**- Autoradiografia.

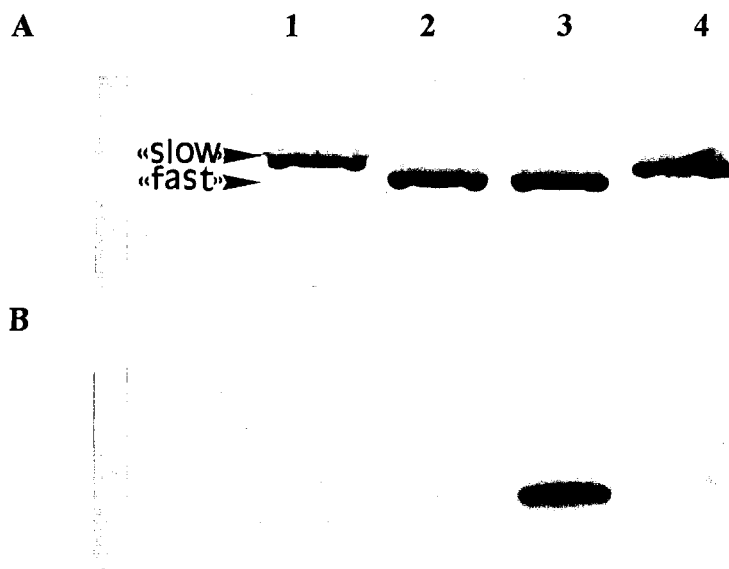


Figura 20- Formação do complexo do $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ com a DAP. Preparações de DAP purificada foram incubadas com $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ (13 nM) e submetidas a 4-17% PAGE e autoradiografia. As concentrações de DAP e tripsina usadas foram $0,4 \mu\text{M}$. 1- DAP; 2- DAP pré-incubada com tripsina; 3- DAP co-incubada com tripsina; 4- DAP co-incubada com tripsina e inibidor de tripsina. (A)- Coloração com azul de Coomassie; (B)- Autoradiografia.

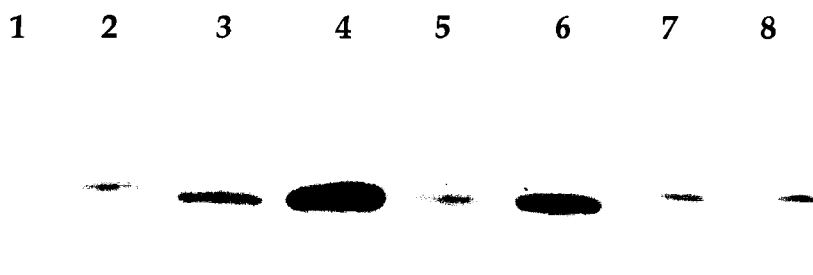


Figura 21- Autoradiografia de PAGE nativo 4-17% demonstrando a influência da razão molar proteína:protease na ligação de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ à DAP. As preparações contendo DAP purificada ($0,4 \mu\text{M}$) foram incubadas com $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ (13 nM). 1- $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$; 2- DAP; 3- razão molar DAP:tripsina 1:1 (pré-incubação); 4- razão 1:1 (co-incubação); 5- razão 1:2 (pré-incubação); 6- razão 1:2 (co-incubação); 7- razão 1:1 (co-incubação na presença do inibidor da tripsina); 8- razão 1:2 (co-incubação na presença do inibidor da tripsina).

Para caracterizar a especificidade da ligação realizaram-se experiências de competição com os ligandos não marcados radioativamente. A adição de concentrações crescentes de IL-6 não marcada (25 nM, 50 nM, 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1 μ M) provocou o deslocamento de [125 I]-IL-6 do complexo DAP/[125 I]-IL-6 e AMF/[125 I]-IL-6, sugerindo que a ligação era de grande afinidade (Fig. 22). No caso do [125 I]-IGF-I, realizaram-se experiências de competição adicionando concentrações crescentes de IGF-I na ausência ou na presença de tripsina. Nas experiências em que se incluía a DAP ou AMF purificadas e tripsina, durante o período de incubação, verificou-se que a adição de concentrações crescentes do ligando não radioactivo promovia o deslocamento de [125 I]-IGF-I da ligação, sugerindo que a ligação era de grande afinidade (Fig.23). A concentração necessária de ligando não marcado para se verificar um decréscimo da ordem dos 50% (I_{50}) na ligação de [125 I]-IGF-I à DAP/AMF foi determinada como sendo 0,9 μ M (Fig. 23C).

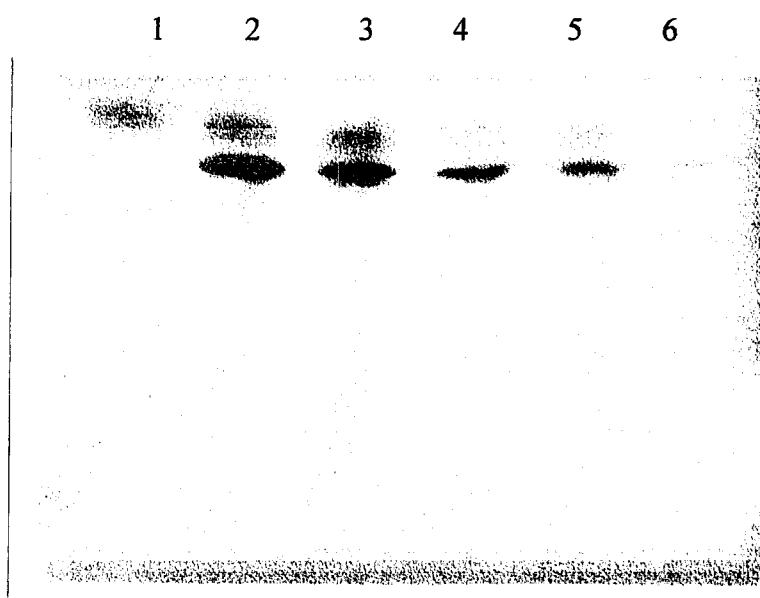


Figura 22- Complexos [125 I]-IL-6 / DAP-tripsina e deslocamento da ligação [125 I]-IL-6 por acção de concentrações crescentes de IL-6 (25 nM, 50 nM, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M) não marcada radioativamente. As amostras foram separadas por electroforese em PAGE nativo 4-17% e o gel foi submetido a autoradiografia: 1- [125 I]-IL-6; 2- 25 nM; 3- 50 nM; 4- 0,25 μ M; 5- 0,5 μ M; 6- 1 μ M.

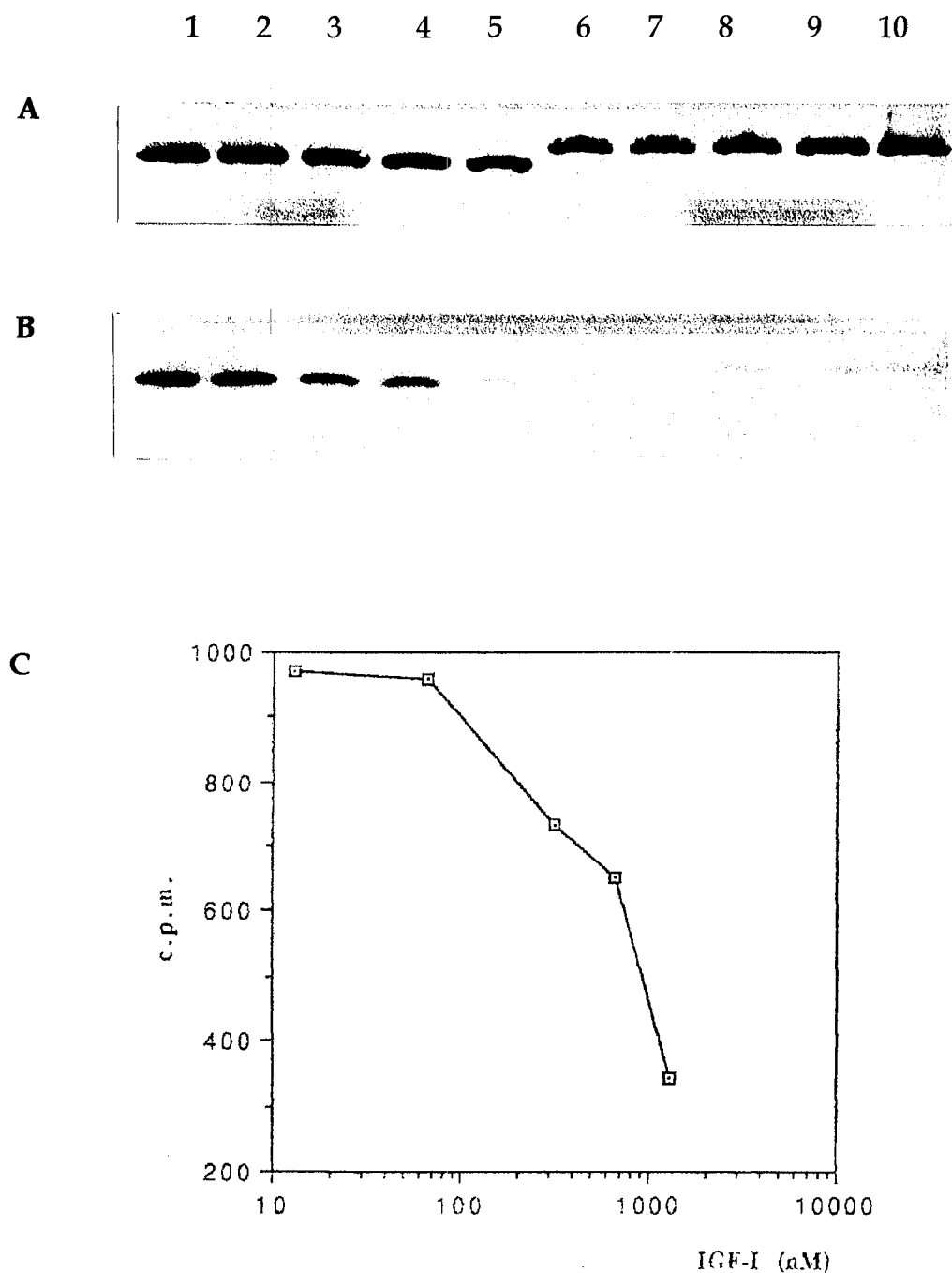


Figura 23- Complexos $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ / DAP-tripsina e deslocamento da ligação $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ por acção de concentrações crescentes de IGF-I não marcado radioativamente.

As amostras foram separadas por electroforese em PAGE nativo 4-17%. (A)- Coloração com azul Coomassie (B)- autoradiografia.

Linhas 1 a 5: incubação de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ com a DAP 0,4 μM , tripsina 0,4 μM e crescentes concentrações de IGF-I não radioactivo. **Linhas 6 a 10:** incubações nas mesmas condições mas sem a presença de tripsina. Usaram-se as seguintes concentrações de IGF-I : 13 nM (linhas 1 e 6); 65 nM (linhas 2 e 7); 0,3 μM (linhas 3 e 8); 0,65 μM (linhas 4 e 9); 1,3 μM (linhas 5 e 10). (C)- Determinação do valor I_{50} para os complexos $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I/DAP}$. As bandas do gel foram cortadas e submetidas a contagem em contador γ para a determinação quantitativa do deslocamento da reacção.

A análise electroforética por SDS/PAGE com ou sem β -mercaptoetanol seguida de autoradiografia demonstrou que o reduzido nível de ligação do $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ pela AMF/DAP na forma "slow" era não covalente, enquanto que a co-incubação da AMF/DAP com o ligando marcado e a tripsina resultava numa associação covalente. Os complexos $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ / proteínas-tripsina não eram alterados por tratamento com SDS ou com o β -mercaptoetanol, levando a considerar que esta interacção é predominantemente covalente. Utilizando o SDS sem o β -mercaptoetanol, verificou-se que o $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ aparecia na banda de 360 kDa correspondente às duas metades da molécula da $\alpha_2\text{M}$ ligadas por pontes dissulfureto. Na presença do SDS e do β -mercaptoetanol o $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ estava associado a uma banda de 97 kDa que resultou da clivagem da "bait region" (Barrett e col., 1979),(Fig.24).

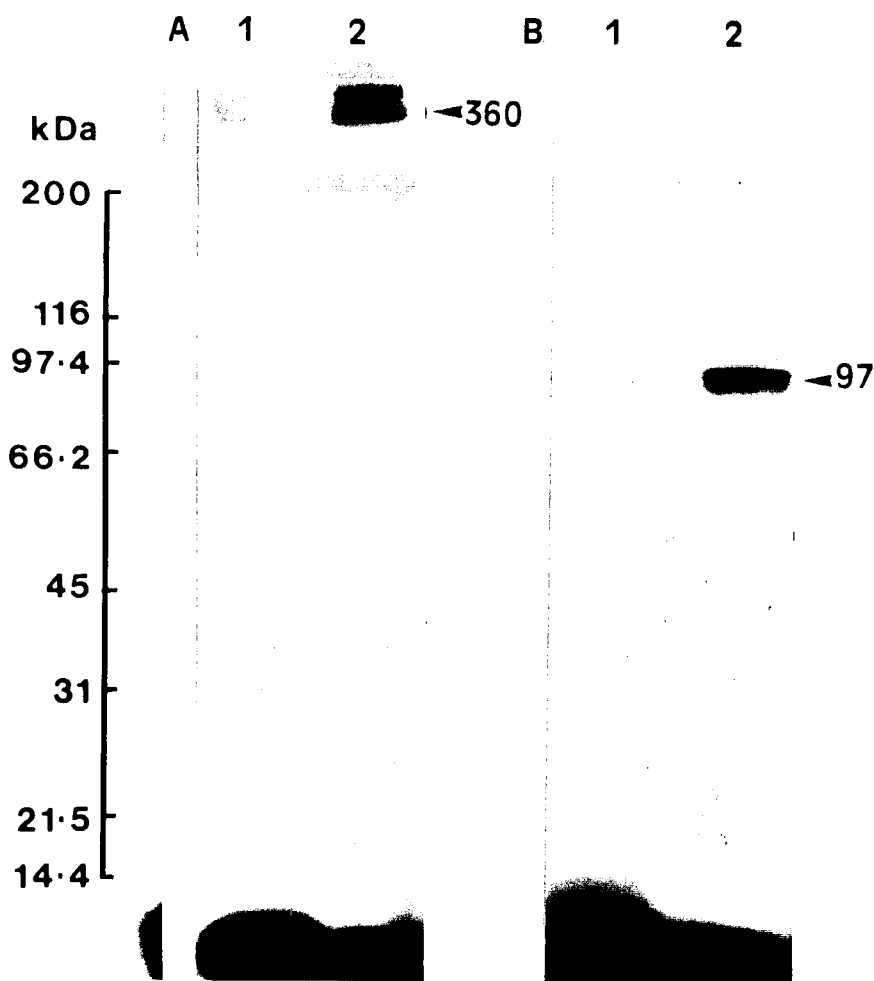


Figura 24- Autoradiografias de SDS-PAGE 4-17% demonstrando a incorporação covalente de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ na AMF. (A)- gel com SDS e sem β -mercaptoetanol. (B)- gel com SDS e com β -mercaptoetanol. 1- incubação da AMF $0,4 \mu\text{M}$ com $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$; 2- co-incubação da AMF $0,4 \mu\text{M}$ com $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ e tripsina $0,4 \mu\text{M}$.

4. Aspectos histológicos das transformações uterinas durante a gravidez e localização do mRNA codificante para a $\alpha 2M$

O estudo da localização do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ foi feito por hibridização *in situ*, em cortes histológicos de parafina. A especificidade da sonda utilizada nas reacções de hibridização foi confirmada por "Northern blot". Nesta técnica utilizou-se o RNA total extraído do tecido decidual no 12º dia de gravidez e como sonda, a mistura de três oligonucleótidos também utilizada para a pesquisa do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ nos cortes histológicos. O "Northern blot" evidenciou a hibridização da sonda com uma banda de 5,2 kb na preparação do RNA total de tecido decidual. No entanto, não foi observada qualquer reacção com o fígado de rato adulto, que como se sabe só expressa o mRNA codificante para a $\alpha 2M$ após a indução de um estado inflamatório (Fig.25).

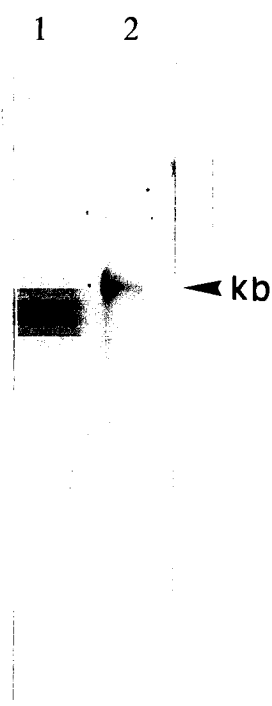


Figura 25- "Northern blot" do RNA total (30 μ g) extraído do fígado de adulto (1) e do RNA total (30 μ g) extraído do tecido decidual no 12º dia de gravidez (2) onde se detectou a presença de uma banda de 5,2 kb correspondente ao mRNA da $\alpha 2M$.

As reacções de hibridização *in situ* foram realizadas com a sonda marcada com digoxigenina. Utilizou-se como controlo positivo o fígado fetal, já que foi demonstrado que este tecido sintetiza o mRNA codificante para a $\alpha 2M$ (Kodelja e col., 1986). Assim, usaram-se cortes histológicos de útero onde o fígado fetal era visível (Fig.26). Como controlo negativo foi usada uma mistura de hibridização que não incluía a sonda. Para confirmarmos que o sinal era proveniente de hibridização com o RNA e não com o DNA

realizaram-se digestões com RNaseA. A digestão fez desaparecer o sinal o que demonstra a sua especificidade.



Figura 26- Hibridização *in situ* do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ em corte transversal de útero no 19º dia de gestação (x 13). Este corte histológico inclui o fígado fetal (seta), que funciona como controlo positivo da reacção de hibridização. GM- glândula metrial; P- placenta.

Realizou-se o estudo da expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ em úteros não grávidos durante todas as fases do ciclo estral, no decíduoma e durante a gravidez.

Durante o ciclo estral não foi detectado o sinal de hibridização em qualquer dos dias do ciclo.

No Rato, o período de gestação tem a duração de 21-22 dias e a implantação do blastocisto ocorre na zona antimesometrial do endométrio, no 5º dia, numa zona de características especiais que é uma extensão do lúmen uterino e se chama câmara de implantação. Nos 6º e 7º dias e em resposta à implantação, as células do estroma do antimesométrio junto ao blastocisto sofrem a reacção decidual, diferenciam-se em células deciduais e formam a zona decidual primária. Posteriormente esta diferenciação propaga-se ao restante endométrio.

Nos dias 5, 6 e 7 de gravidez não foi detectada a expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$.

Dias 7-8

No dia 7 o lúmen uterino possui uma extensão antimesometrial que é a câmara de implantação. A câmara de implantação contém o blastocisto e a cripta decidual que se estende no antimesométrio mais profundamente. A decidua antimesometrial está em expansão e apresenta-se dividida em três regiões: a zona de implantação, antimesometrial ao embrião e com células deciduais em degeneração; a zona decidual primária com células deciduais grandes, justapostas, e sem espaços intercelulares e a zona decidual secundária com menor densidade celular (Fig.27A). A zona decidual primária é a primeira a decidualizar e rodeia o embrião no antimesométrio. A decidua primária está rodeada por uma região de células que decidualizaram, as células deciduais maduras. Estas, são células grandes, poliédricas, justapostas e paralelas umas às outras. Os seus núcleos são redondos e os nucléolos proeminentes, por vezes são binucleadas e o seu citoplasma apresenta basofilia. À medida que nos vamos afastando do embrião observam-se células com morfologia intermédia entre células deciduais maduras e fibroblastos e que poderão ser chamadas de células pré-deciduais, de morfologia estrelada, com prolongamentos citoplasmáticos e separadas por grandes espaços extracelulares (Fig.27B). As células pré-deciduais aparecem por sua vez rodeadas por uma camada de fibroblastos (células do estroma não diferenciadas) que se encontram junto ao miométrio.

O epitélio uterino junto ao estroma decidualizado da câmara de implantação é descontínuo e as células epiteliais estão em degeneração sendo possível observarem-se restos celulares. As células epiteliais do lúmen no pólo mesometrial apresentam morfologia normal.

No 8º dia a reacção decidual que tinha começado antimesometrialmente no estroma, circunscrita aos locais onde ocorreu a implantação do blastocisto, está agora presente numa grande área da decidua antimesometrial. Neste dia, a decidua mesometrial e lateral estão num estágio muito inicial de decidualização. A expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ é pela primeira vez detectável, embora demasiado fraca para ser visível em fotografia. A expressão encontra-se no citoplasma das células da decidua lateral entre o antimesométrio e o mesométrio formando duas manchas de sinal de cada lado do embrião.

Dia 9

No dia 9, o embrião ocupa toda a câmara de implantação no antimesométrio mas não está em contacto com os tecidos do mesométrio. O lúmen uterino está rodeado por células deciduais e o seu epitélio está em degeneração. O lúmen na sua porção mesometrial (para a qual o cone ectoplacentário se dirige) apresenta continuidade com o lúmen dos sinusóides maternos. Estes sinusóides aparecem na vizinhança do lúmen da câmara de implantação no pólo mesometrial, irradiando mesometrialmente e lateralmente desde o lúmen da câmara mesometrial (Fig.28A). Os lúmens destes sinusóides estão dilatados, as células endoteliais aparecem hipertrofiadas e observam-se alguns leucócitos marginalizados. Estes sinusóides estão rodeados por células do estroma decidualizadas.

A decidua antimesometrial pode facilmente distinguir-se da recentemente formada decidua mesometrial pelo aspecto das células deciduais que no antimesométrio são células grandes, por vezes binucleadas e de citoplasma marcadamente basófilo. Limitando externamente a decidua antimesometrial e separando-a da zona de fibroblastos não decidualizados, existe uma fina camada de células compactadas correspondente à área descrita como "cápsula fibrinoide" por Bulmer e Dickson (1961), (Fig.28A).

No mesométrio o estroma junto ao lúmen uterino é constituído por uma massa compacta de células deciduais enquanto que mais na periferia as células deciduais apresentam-se com grandes espaços intercelulares.

Os locais de expressão do mRNA codificante para a DAP são idênticos aos do 8º dia embora com maior intensidade de sinal. O sinal era especialmente intenso nas células da decidua lateral em redor do embrião. As células deciduais do pólo mesometrial eram essencialmente negativas. A camada muscular circular apresentava expressão. Neste dia, o sinal foi ainda detectado na decidua antimesometrial na zona da "cápsula fibrinoide" (Fig 28B).

A

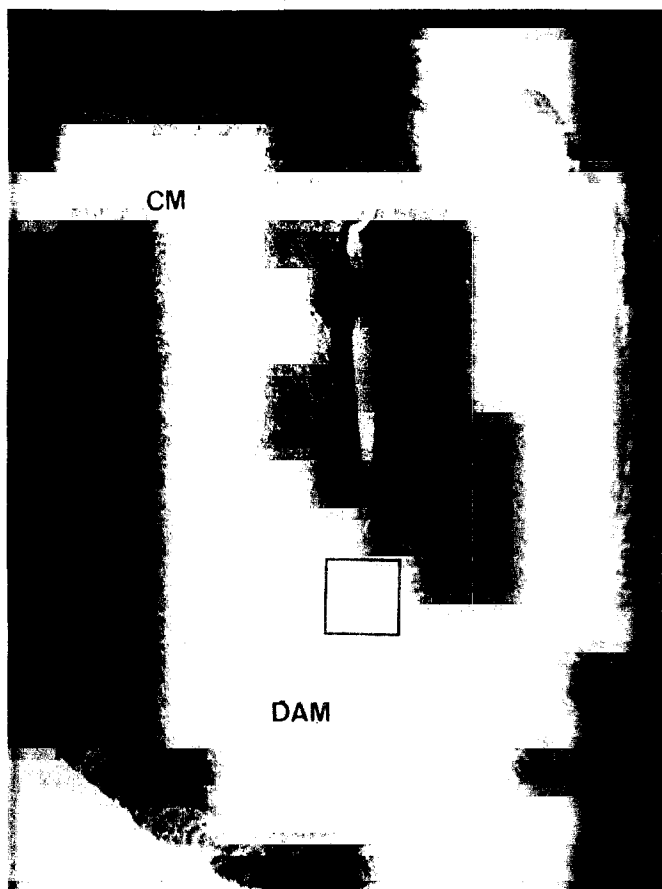
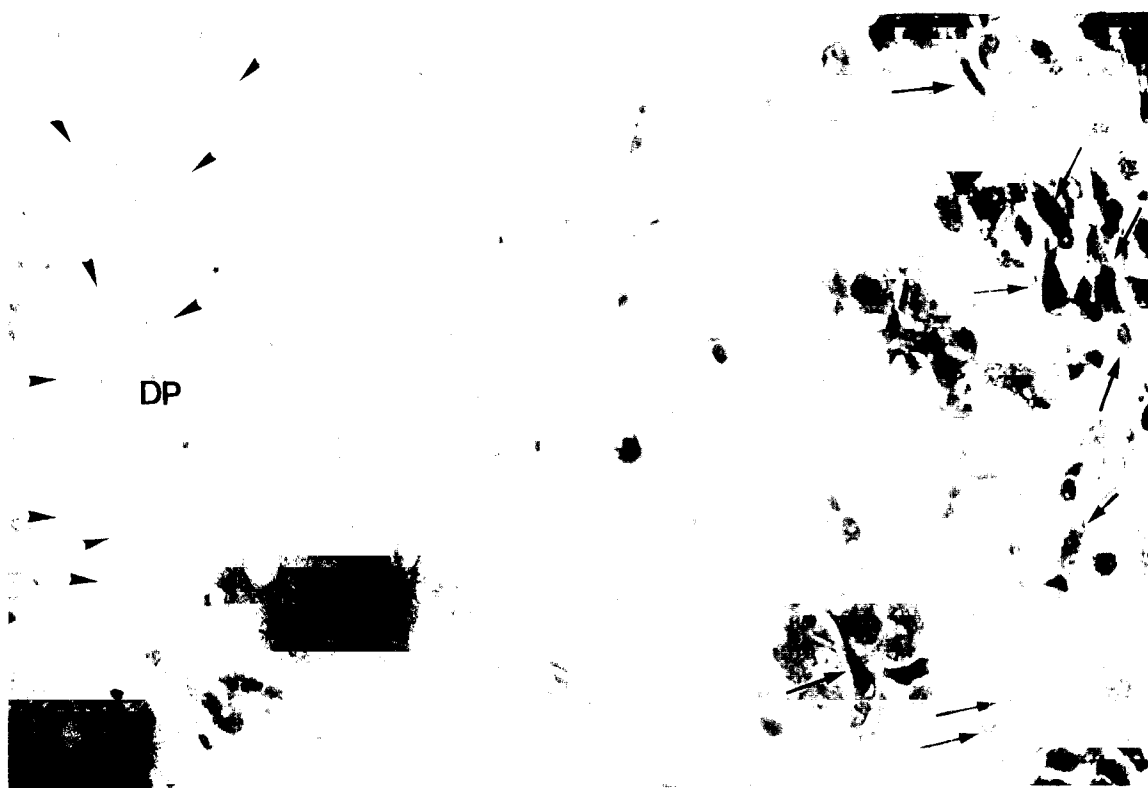


Figura 27A,B- (A)- Corte transversal de útero no 7^o dia de gravidez (x60). Coloração com hematoxilina e eosina. Notar na decídua antimesometrial a zona decidual primária (assinalada no quadrado). (B)- ampliação da zona assinalada em A (x400). As células decíduais maduras apresentam citoplasma basófilo e nucléolos proeminentes (►). Rodeando a decídua primária encontram-se as células pré-decíduais de forma estrelada e com prolongamentos citoplasmáticos (→). DAM- Decídua antimesometrial; DP- Decídua primária; CM- Camada muscular circular; CL-Camada muscular longitudinal.

B



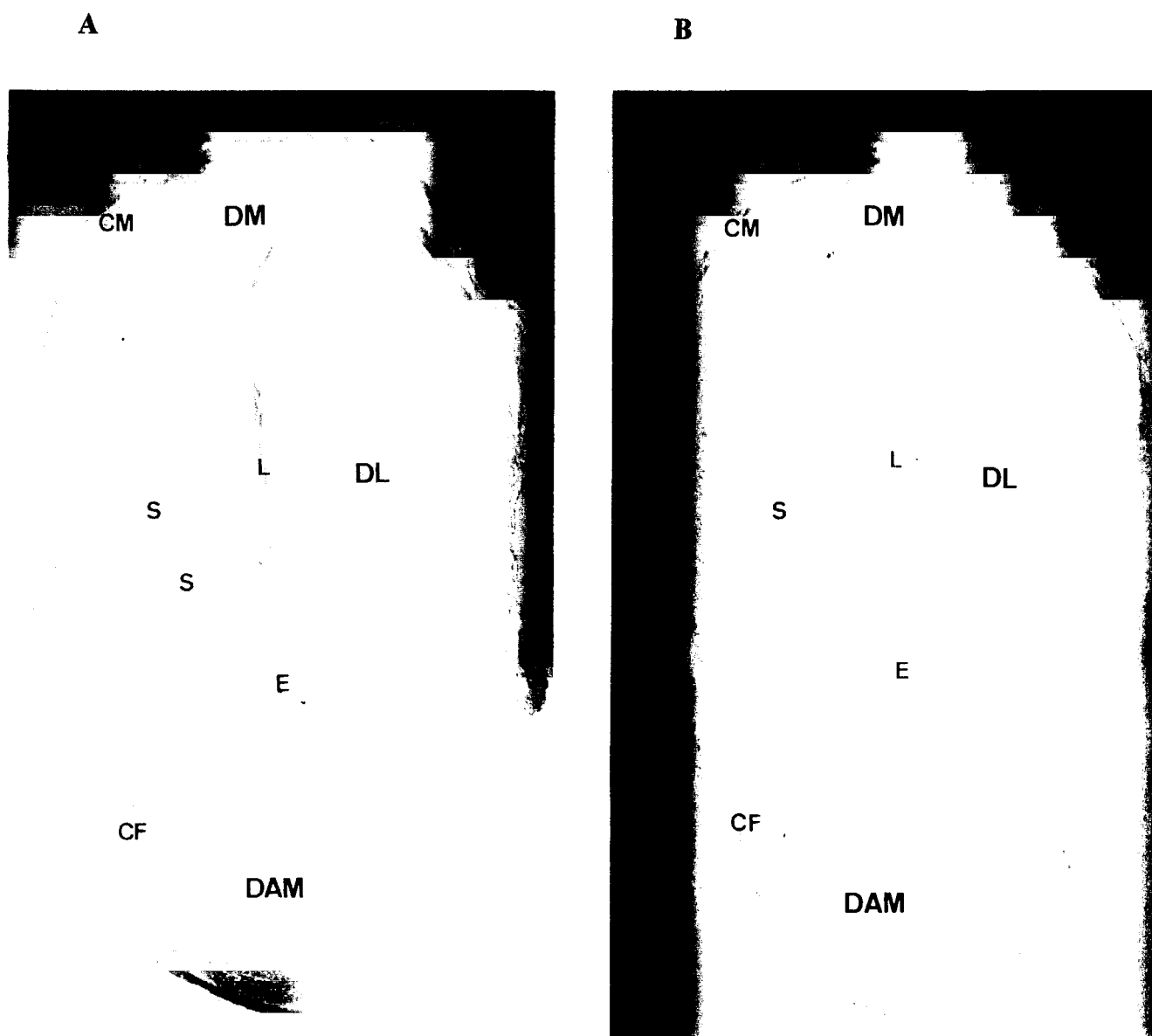


Figura 28- Corte transversal de útero no 9º dia de gravidez (x 40). **(A)**- Coloração com hematoxilina/eosina; **(B)**- Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$, que pode ser encontrada na zona da cápsula fibrinoide, decídua lateral e camada muscular circular. DM- Decídua mesometrial; MC- Camada muscular circular; DL- Decídua lateral; E- embrião; CF- Cápsula fibrinoide; DAM- Decídua antimesometrial; L- Lúmen uterino; S- Sinusóides.

Dia 10

No 10º dia, o estroma uterino atingiu o máximo de diferenciação e pode dividir-se em várias regiões: a decidua antimesometrial; a cripta decidual, localizada na extremidade antimesometrial da câmara de implantação; a decidua mesometrial com células de morfologia estrelada e células contendo grânulos, de localização mesometrial em relação ao embrião; a zona de células decíduais ricas em glicogénio entre o antimesométrio e o mesométrio; e uma região de células do estroma indiferenciadas entre o estroma decidualizado e o miométrio.

A decidua antimesometrial expandiu-se totalmente ocupando praticamente toda a área do antimesométrio. As células decíduais mais próximas do embrião aparecem com sinais de degeneração. À medida que nos afastamos do embrião e nos aproximamos do miométrio, a densidade celular diminui e aparecem maiores espaços intercelulares. Junto ao miométrio continua a observar-se uma zona de estroma não decidualizado e a cápsula fibrinóide (Fig. 29A).

No 10º dia, o embrião cresceu em direcção ao mesométrio e ocupa já toda a câmara de implantação. No pólo mesometrial está localizado o triângulo mesometrial onde a glândula metrial se está a desenvolver e onde existem células de tipologia fibroblástica e células granulares. A decidua mesometrial está claramente diferenciada. A sua zona mais externa está imediatamente adjacente ao estroma não decidualizado e inferior à camada muscular circular. Segue-se uma zona principal, onde existem dois tipos de células, as células decíduais e as células granulares. As células decíduais mesometriais são mais pequenas que as do antimesométrio, apresentam-se com citoplasma basófilo e por vezes binucleadas. São células que possuem numerosos prolongamentos citoplasmáticos o que lhes confere um aspecto estrelado ou espinhoso. Por vezes as células comunicam entre si por prolongamentos citoplasmáticos existindo no entanto muitos espaços intercelulares. Estas células é que conferem o aspecto característico da decidua mesometrial. As células granulares são raras, possuem grânulos no seu citoplasma, por vezes são binucleadas e encontram-se entre as células decíduais sobretudo na região central do mesométrio. Lateralmente ao embrião e na fronteira entre o antimesométrio e o mesométrio existe a decidua lateral com a zona das células ricas em glicogénio. O seu citoplasma aparece pouco corado com a coloração de rotina (hematoxilina/eosina) (Fig.29A). Estas células rodeiam capilares de lúmen dilatado. Nesta zona os sinusóides na vizinhança da câmara de implantação, irradiam lateralmente para o lúmen, aparecendo dilatados e com as células endoteliais hipertrofiadas com núcleos salientes para o lúmen. É possível

observarem-se leucócitos marginalizados. Os lúmens destes sinusóides são muitas vezes contínuos com o lúmen da câmara de implantação (Fig.29C).

O cone ectoplacentário iniciou a invasão dos tecidos maternos. As células do cone ectoplacentário migraram para o espaço anteriormente ocupado pelo lúmen uterino e aparecem em contacto com o estroma e as células decíduais. À medida que o cone ectoplacentário ocupa a região mesometrial, as células do trofoblasto vão contactando com os sinusóides e assim *in vivo* o cone ectoplacentário está em contacto com o sangue materno que flui nos sinusóides.

Quanto à expressão do mRNA codificante para a DAP, no antimesométrio as células decíduais continuavam sem reactividade e as células da cápsula fibrinóide continuavam a apresentar um sinal intenso. Nesta região, o miométrio, não continha qualquer sinal (Fig. 29B e D), enquanto que na região mesometrial a camada muscular, já em adelgaçamento, e as células do endométrio adjacente apresentavam uma forte positividade (Fig.29B). Foi ainda encontrada uma marcação intensa na decidua lateral, na área das células ricas em glicogénio, embora, decrescendo para a zona central da região mesometrial, não sendo detectada expressão na área central da decidua mesometrial (Fig. 29 B e D).

Dia 11

No 11^o dia, o novo lúmen uterino está a formar-se de ambos os lados do antimesométrio e a separar a decidua antimesometrial que já regrediu e constitui agora a decidua capsular (Fig.30A). Essa separação ocorre na zona fibrosa de tecido conjuntivo da cápsula fibrinóide, local onde mais tarde se dará a clivagem da parede uterina durante o parto. No pólo mesometrial observa-se a invasão da decidua pelas células trofoblásticas do cone ectoplacentário (Fig. 30A,C).

A expressão na decidua mesometrial era semelhante à do 10^o dia, isto é, as células decíduais da decidua lateral e as células decíduais do mesométrio apresentavam expressão, embora agora mais intensa na zona central do mesométrio. No pólo mesometrial, o miométrio mostrava um intenso sinal na camada muscular junto ao estroma não decidualizado (Fig.30B). Na região do triângulo mesometrial, as células tipo fibroblásticas adjacentes à camada muscular circular iniciaram a expressão do mRNA enquanto que no cone ectoplacentário, que invadia a decidua materna, não foi detectado qualquer sinal. (Fig. 30B,D).



Figura 29 A, B- Corte transversal de útero no 10^o dia de gravidez (x 36). **(A)-** Coloração com hematoxilina/ eosina; **(B)-** Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$. A expressão encontra-se na zona da decidua mesometrial e na zona da decidua lateral. A decidua antimesometrial é negativa excepto na zona da cápsula fibrinoide. As zonas delimitadas por quadrados estão representadas em (C) e (D). DM- Decidua mesometrial; DAM -Decidua antimesometrial; CM- Camada muscular circular; DL -Decidua lateral; E- embrião; CF- Cápsula fibrinoide.



Figura 29 C, D- Corte transversal de útero no 10º dia de gravidez (x200). **(C)-** Ampliação do quadrado representado na Fig.29B. A zona central do mesométrio e o embrião não exibem o sinal enquanto a zona lateral da decidua, na zona das células ricas em glicogénio, apresenta sinal indicativo da expressão. De notar o lúmen dilatado de muitos sinusóides e a sua fusão com o lúmen uterino já todo preenchido pelo embrião. **(D)-** Ampliação do quadrado representado na Fig.29B mostrando a decidua do antimesométrio sem sinal, enquanto a cápsula fibrinoide se apresenta positiva. DAM- Decidua antimesometrial; CM- Camada muscular circular; DL -Decidua lateral; E- embrião; CF- Cápsula fibrinoide; Ei- Estroma não decidualizado; S- Sinusóides; CE- Cone ectoplacentário.



Figura 30 A, B- Corte transversal de útero no 11^o dia de gravidez (x 30). As zonas delimitadas por quadrados estão representadas em C e D. **(A)-** Coloração com hematoxilina/eosina; **(B)-** Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$ em toda a decidua mesometrial e lateral. As células do trofoblasto do cone ectoplacentário não expressam o sinal. DM- Decidua mesometrial; CM- Camada muscular circular. CE- Cone ectoplacentário; Lu- Lúmen uterino; DC- Decidua capsular.

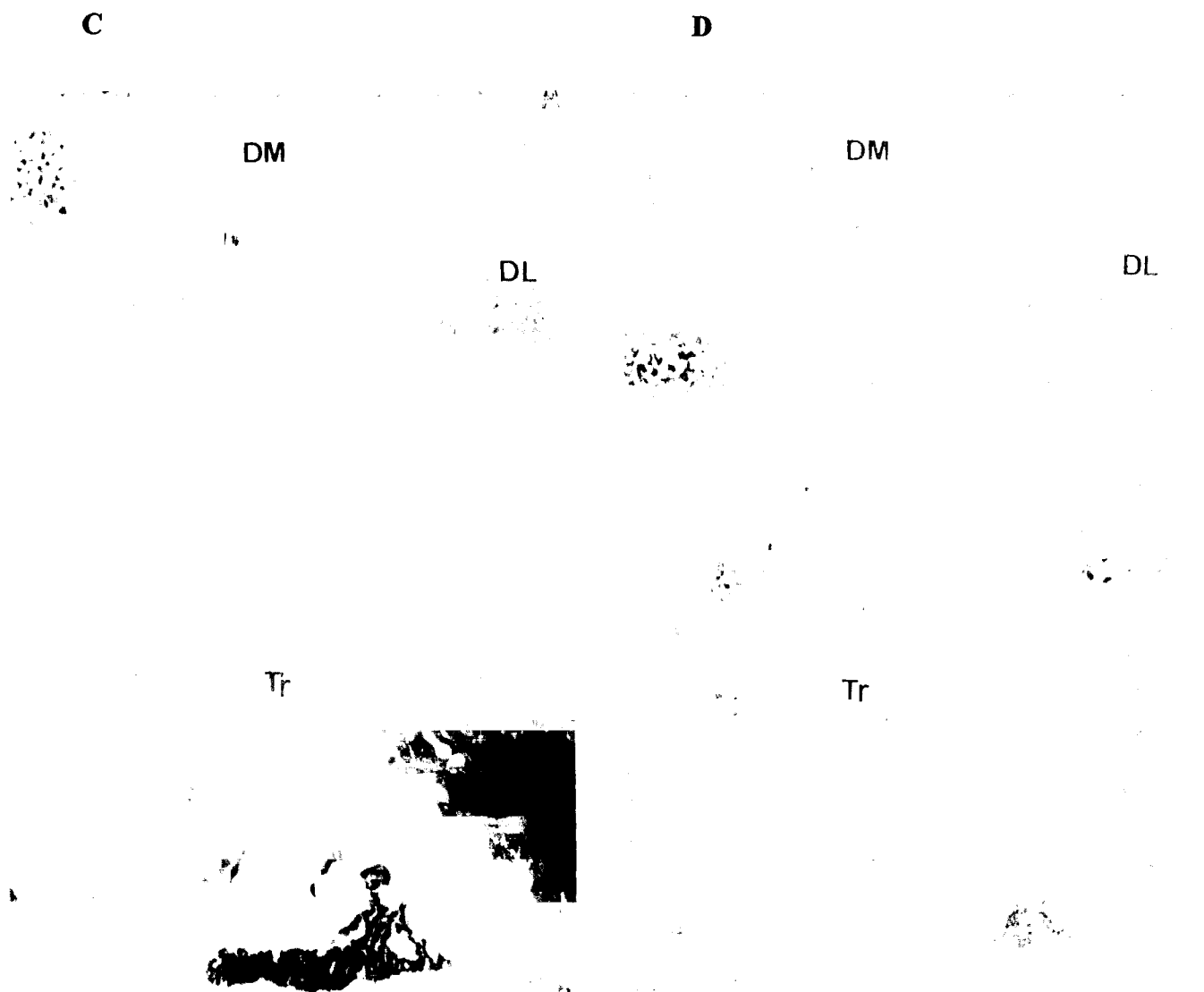


Figura 30 C, D- Corte transversal de útero no 11^o dia de gravidez. **(C)-** Ampliação do quadrado representado na Fig. 30A, evidenciando a zona do cone ectoplacentário (x200); **(D)-** Ampliação do quadrado representado na Fig. 30B, demonstrando a expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ (x200). As células do trofoblasto do cone ectoplacentário não expressam o sinal, enquanto que a zona da decidua adjacente apresenta expressão. DM- Decidua mesometrial; DL- Decidua lateral; Tr- Trofoblasto.

Dia 12

No 12º dia, a placenta definitiva está já em formação na região mesometrial, observando-se nessa zona a invasão pelo trofoblasto da artéria central do mesométrio (Fig. 31A). A decidua antimesometrial forma, agora, uma fina camada de células deciduais em degeneração constituindo a decidua capsular. Entre a decidua mesometrial e a camada muscular circular é possível observar-se uma fina camada acidófila de células do estroma compactadas, que está presente lateralmente, e se estende na direcção do mesométrio. As células granulares da glândula metrial são abundantes no triângulo mesometrial e tendem a acumular-se à volta dos vasos sanguíneos.

O mRNA codificante para a $\alpha 2M$ era expresso em todas as células deciduais do mesométrio, com maior intensidade na área central junto ao cone ectoplacentário invasor e junto aos vasos invadidos por células trofoblásticas, mas não nas células granulares (Fig. 31B). A camada muscular circular continuava a expressar o sinal na região do mesométrio. Não se detectaram transcritos nas células trofoblásticas do cone ectoplacentário (Fig.31B).

Dia 13

No 13º dia, a placenta continua em desenvolvimento. Algumas células do cone ectoplacentário ficam cada vez mais preenchidas com glicogénio e com aspecto vacuolizado em hematoxilina e eosina, designando-se por células glicogénicas. O crescimento do embrião na cavidade amniótica vai provocando um aumento do tamanho do útero, e a camada muscular, sob esta pressão, vai ficando mais adelgada (Fig. 32A). A decidua mesometrial vai progressivamente atrofiando formando uma faixa estreita, a decidua basal.

Na base do mesométrio encontra-se a glândula metrial contendo células tipo fibroblásticas e células contendo numerosos grânulos, as células granulares da glândula metrial. A decidua está separada da glândula metrial somente por algumas fibras da camada muscular circular que entremeiam com numerosas células granulares da glândula metrial. É possível observar-se na zona central do mesométrio, a artéria placentária que cursa através da glândula metrial e abastece de sangue os canais arteriais maternos da placenta (Fig. 32 A, C). As células trofoblásticas endovasculares, que apresentam forte basofilia, forram a parede da artéria placentária e estão em contacto com o estroma composto por células deciduais e células granulares da glândula metrial (Fig. 32 A, C). As células tipo fibroblastásticas formam conjuntamente com as células granulares da

glândula metrial e fibras do conjuntivo característicos arranjos de bainhas em volta dos grandes vasos maternos.

Neste dia, a expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ foi observada em todo o mesométrio embora nas áreas laterais não existisse uma expressão tão intensa como no 12º dia (Fig. 32B). A expressão continuou muito intensa à volta dos vasos sanguíneos invadidos por células trofoblásticas que agora se estendiam até à glândula metrial (Fig. 32B, D). Nesta zona, as células tipo fibroblásticas apresentavam forte positividade enquanto que as células granulares da glândula metrial e as células trofoblásticas eram negativas. A camada muscular circular, em estiramento, evidenciou uma intensa positividade enquanto que na zona do antimesométrio não apresentava o sinal. O sinal também não era detectável em qualquer das zonas da placenta contrastando com a intensa expressão na decidua basal adjacente.

Dia 14

No 14º dia, a glândula metrial apresenta-se bem desenvolvida. As células granulares são abundantes, com citoplasma contendo grânulos acidófilos e de núcleo redondo com neucléolo proeminente (Fig. 33C). Estas células, juntamente com as células fibroblásticas, formam arranjos perivasculares em relação aos vasos maternos. A decidua basal está cada vez mais reduzida a uma pequena faixa imediatamente adjacente à placenta. A camada muscular circular aparece cada vez mais delgada e em ruptura em direcção à glândula metrial. Atravessando esta ruptura aparecem projecções de massas de tecidos da placenta para o mesométrio estirando a camada muscular que está adelgada e por vezes interrompida (Fig. 33A). A camada de células gigantes do trofoblasto, que faz a separação entre os tecidos maternos e a placenta, é interrompida na sua zona central por vasos maternos que se dirigem para os tecidos fetais e estão revestidos por células trofoblásticas (Fig. 33A). A placenta está agora dividida em duas regiões bem definidas, a zona basal e a zona do labirinto.

A expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ continuava a ser intensa na camada muscular. A decidua basal era positiva, em contraste com a negatividade apresentada pela placenta (Fig. 33B). Na região da glândula metrial todas as células expressavam o mRNA codificante para a $\alpha 2M$, à excepção das células granulares da glândula metrial que permaneciam claramente negativas (Fig. 33D). A digestão com RNAase A resultou numa total ausência na detecção da expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ o que demonstra a especificidade de sinal (Fig. 33E).

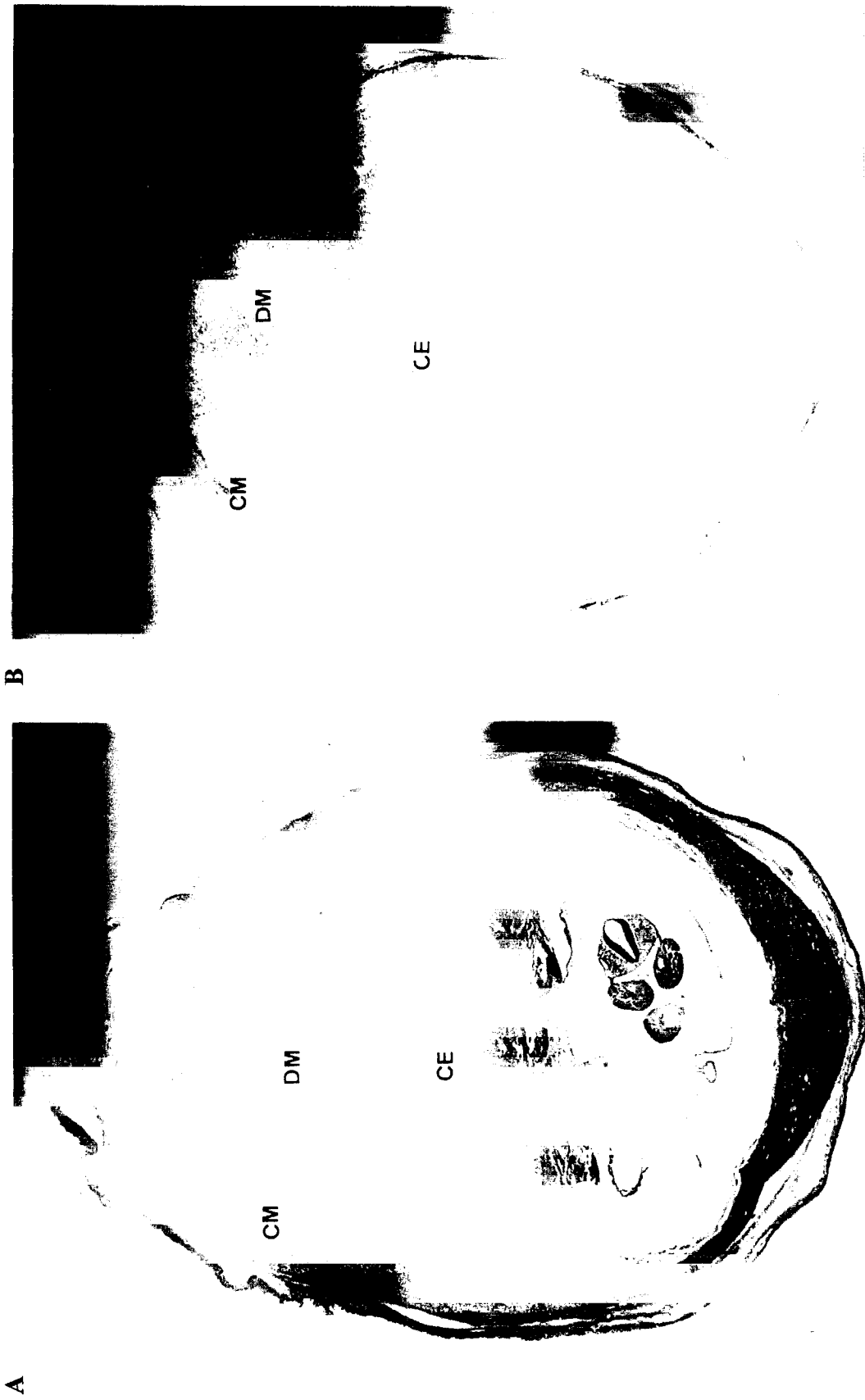


Figura 31 - Corte transversal de útero no 12º dia de gravidez (x 28). (A) - Coloração com hematoxilina e eosina; (B) - Expressão do mRNA codificante para o $\alpha 2M$. A expressão pode ser detectada em toda a decidua mesometrial. DM- Decidua mesometrial; CM- Camada muscular circular; CE- cone ectoplacentário.

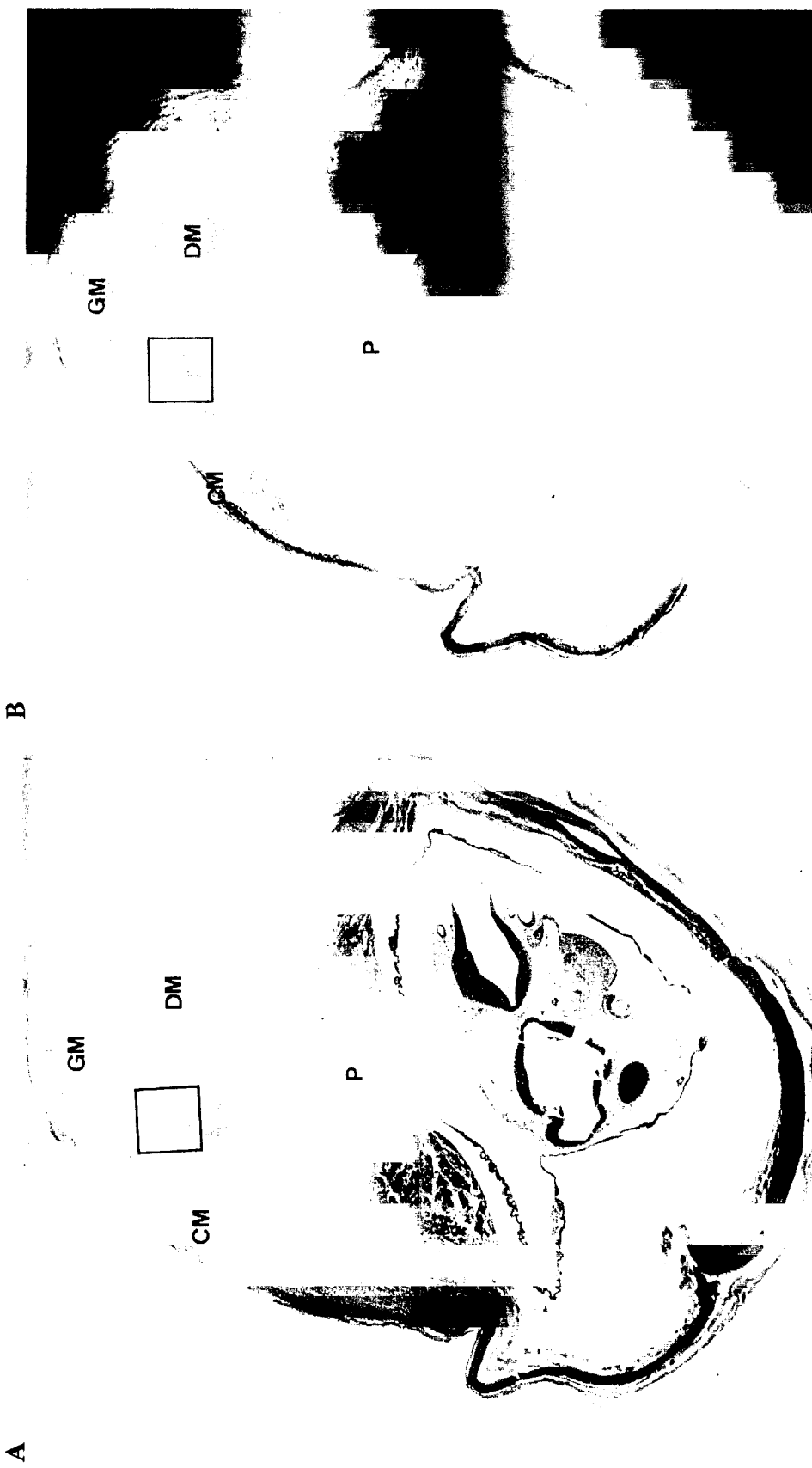


Figura 32 A, B- Corte transversal de útero no 13º dia de gravidez (x 24). (A)- Coloração com hematoxilina e eosina; (B)- Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$. A expressão pode ser detectada em toda a decidua e glândula metrial. A camada muscular continua a apresentar expressão. A placenta é negativa para o mRNA codificante para a $\alpha 2M$. GM- Glândula metrial; CM- Camada muscular circular; P-placenta; DM- Decidua mesometrial. As áreas assinaladas nos quadrados estão representadas em maior ampliação em (C) e (D).



Figura 32 C,D- Corte transversal de útero no 13º dia de gravidez (x200). (C)- Ampliação da zona assinalada na Fig.32A; (D)- Ampliação da zona assinalada na Fig.32B. A expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ é intensa nas células deciduais que rodeiam os vasos invadidos por trofoblasto.

GM- Glândula metrial; CM- Camada muscular circular; V- Vasos sanguíneos; Tr- Trofoblasto

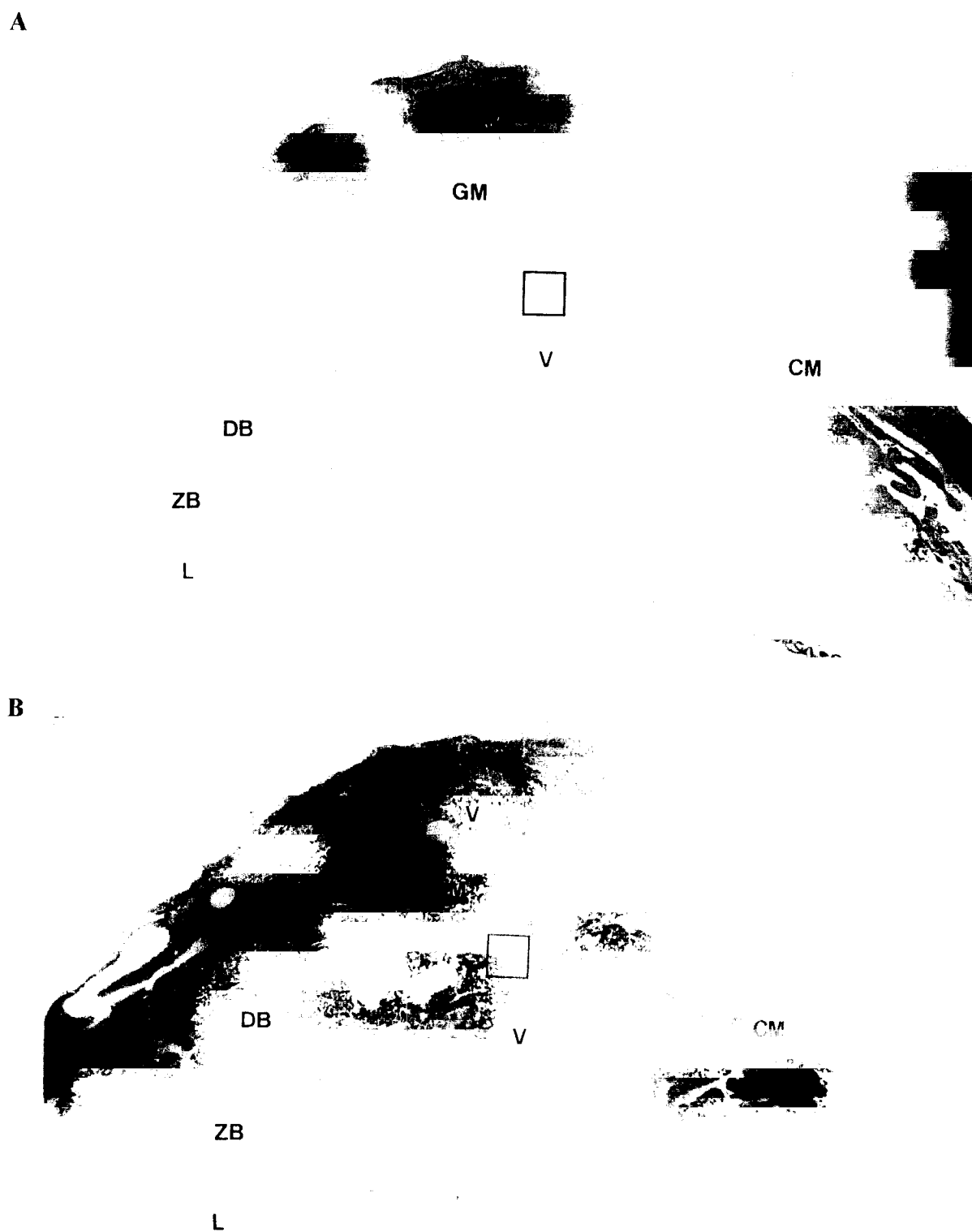


Figura 33 A, B- Corte transversal de útero no 14^o dia de gravidez (x36). **(A)-** Coloração com hematoxilina/eosina; **(B)-** Expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$. A expressão é intensa na glândula metrial, na decidua basal e na camada muscular circular. Na placenta não foi detectado qualquer sinal. Os quadrados assinalam as áreas ampliadas nas Figs 33 C e D. GM- Glândula metrial.; DB- Decidua basal; CM- Camada muscular circular; V- Vasos sanguíneos; ZB- Zona basal; L- Labirinto.

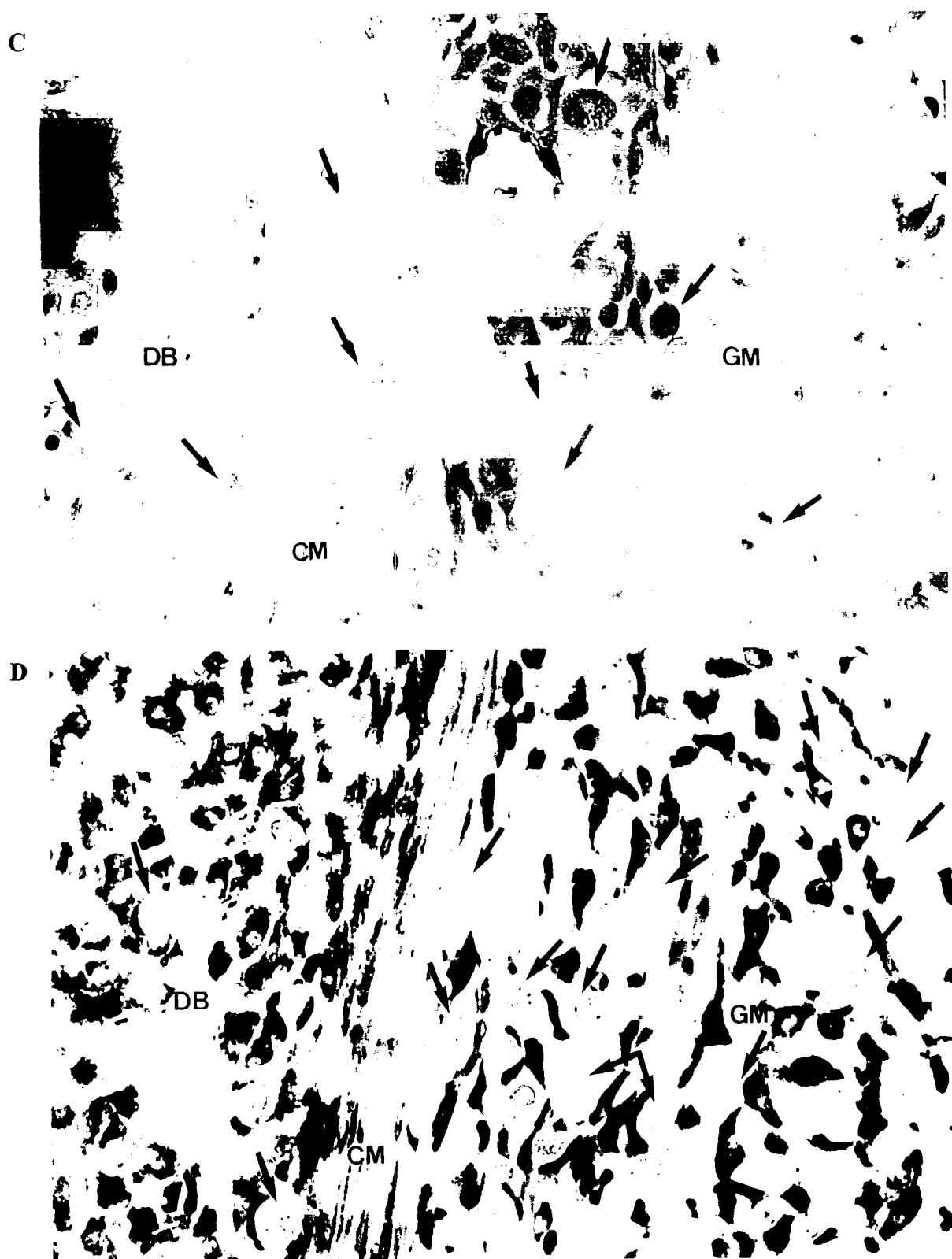


Figura 33 C, D- Corte transversal de útero no 14º dia de gravidez. Ampliações dos quadrados assinalados nas Figs 33A e B (x400). (C)- Coloração com hematoxilina e eosina; (D)- Expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$. A expressão é intensa nas células da decidua basal e nas células da glândula metrial, mas não é detectada nas células granulares da glândula metrial assinaladas com setas. GM- Glândula metrial; DB- Decidua basal; CM- Camada muscular circular.

E

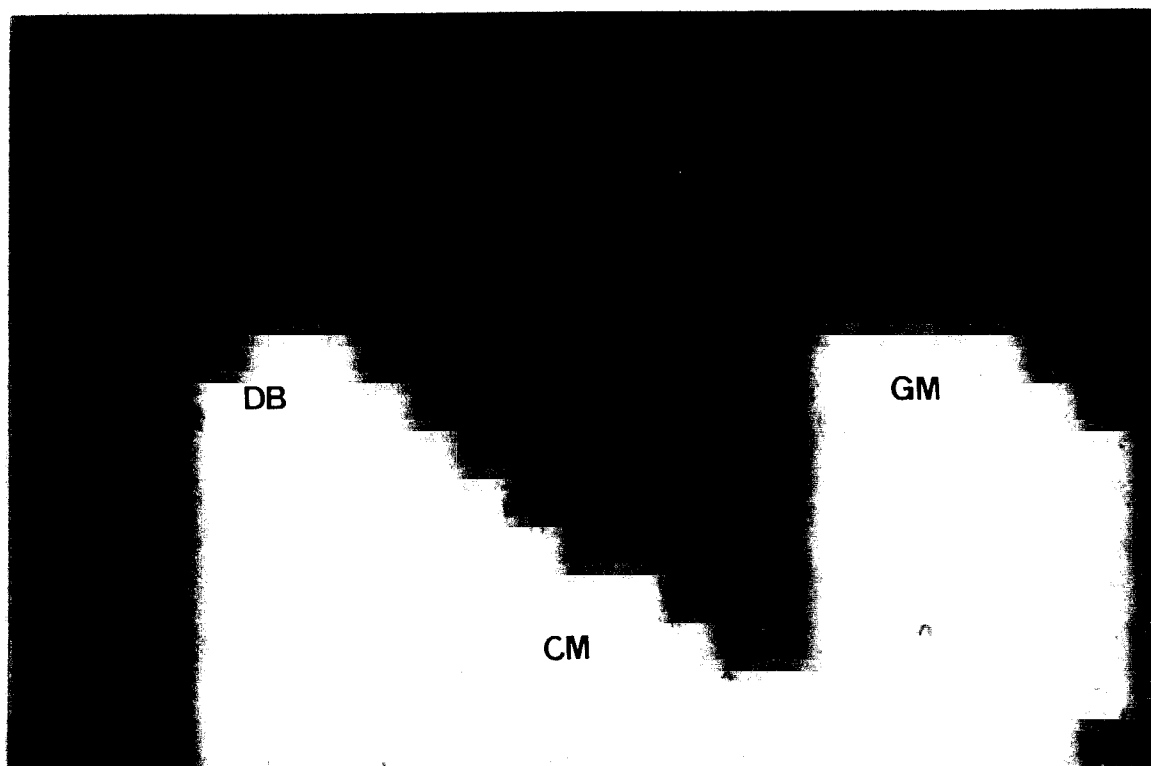


Figura 33 E- Corte transversal de útero no 14^o dia de gravidez. (x400) em que se fez a digestão do corte com a RNAase A. A digestão do RNA resultou numa total ausência da detecção do mRNA codificante para $\alpha 2M$. Utilizou-se um corte consecutivo ao da Fig.32D e está representada a mesma área dessa figura. GM- Glândula metrial; DB- Decidua basal; CM- Camada muscular circular.

Dias 16-19

A partir do dia 16 a organização estrutural dos tecidos uterinos não sofre mudanças acentuadas mas o útero sofre um aumento de diâmetro devido ao crescimento do feto e da placenta. Por volta do dia 16 a placenta atinge o seu máximo de diferenciação e desenvolvimento sobretudo à custa da expansão da zona do labirinto. A glândula metrial é agora muito grande e estende-se para o mesentério. A decidua basal está reduzida a uma faixa estreita adjacente à placenta (Fig. 34A). Este tecido sofre uma regressão progressiva e no final da gestação está atrofiado restando uma fina camada a separar a glândula metrial da placenta (Fig. 35A).

A expressão para o mRNA codificante para a $\alpha 2M$ não sofreu modificações durante os últimos estádios da gestação. O sinal continuou a ser detectado na glândula metrial, na camada muscular circular e na decidua basal até à sua regressão, tal como demonstrado para o 16º dia na Fig. 34B. As células granulares da glândula metrial continuaram sem expressão do mRNA. No 19º dia, a decidua basal, que está reduzida a uma pequena faixa, continua a expressar o mRNA. A expressão era ainda intensa nas células da glândula metrial, permanecendo negativa nas células granulares e na placenta (Fig. 35B).

Deciduoma

O padrão de expressão observado no deciduoma foi essencialmente o mesmo que na gravidez. No antimesométrio não era visível qualquer sinal. No mesométrio o mRNA era expresso nas células deciduais e nas células da camada muscular circular. Na glândula metrial o sinal era intenso nas células fibroblásticas enquanto as células granulares não apresentavam expressão (Fig. 36).

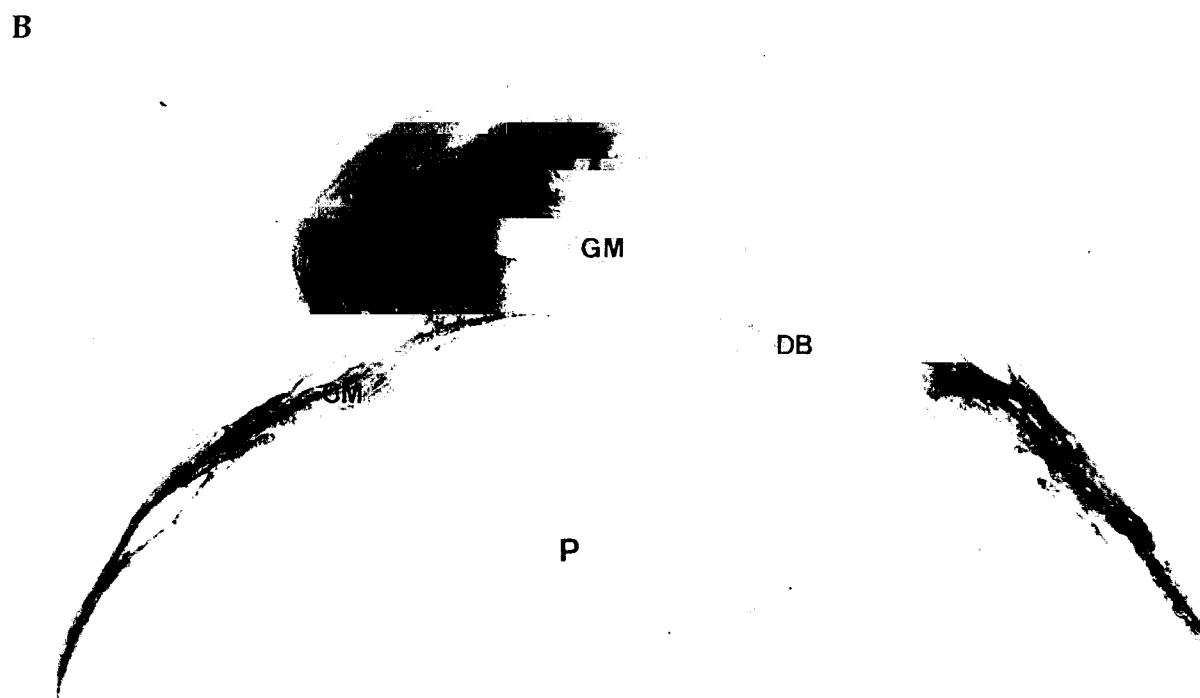
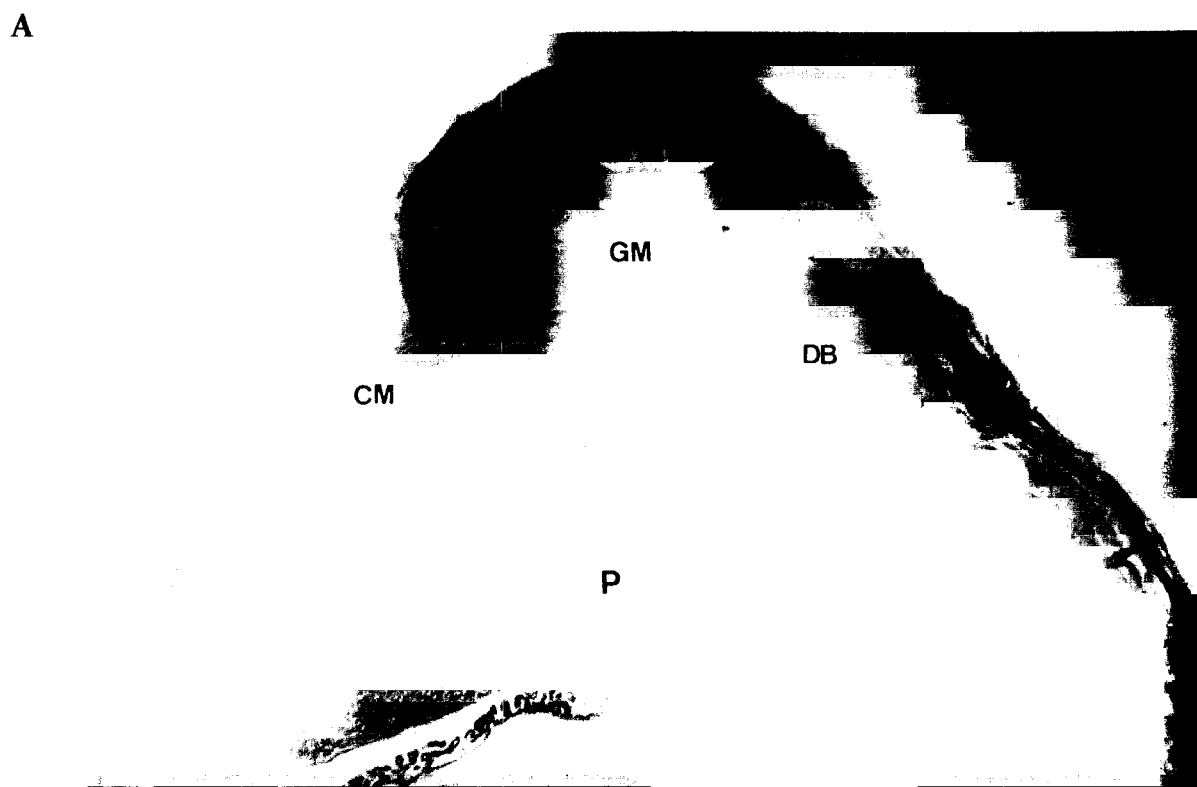


Figura 34- Corte transversal de útero no 16^o dia de gravidez (x30). **(A)-** Coloração com hematoxilina/eosina; **(B)-** Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$. A expressão é intensa na glândula metrial, na camada muscular circular e na decidua basal. A placenta não expressa o sinal. GM- Glândula metrial; CM- Camada muscular circular; DB- Decidua basal; P- placenta.



Figura 35- Corte transversal de útero no 19º dia de gravidez (x28). **(A)-** Coloração com hematoxilina e eosina; **(B)-** Expressão do mRNA codificante da $\alpha 2M$. A expressão é intensa na glândula metrial. A placenta não expressa o sinal. GM- Glândula metrial; DB- Decidua basal; P-placenta.

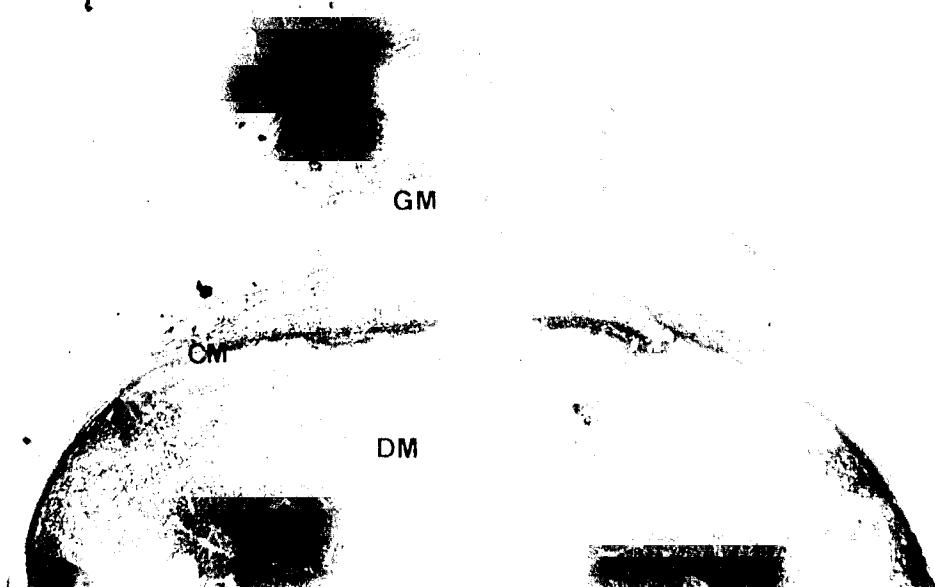


Figura 36- Corte transversal de decíduoma (x30). O padrão de expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ é essencialmente o mesmo que o encontrado no útero grávido. O sinal pode observar-se na decídua mesometrial, glândula metrial e camada muscular circular.

GM- Glândula metrial; CM- Camada muscular circular; DM- Decídua mesometrial.

5. Localização dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II

Nas reacções de hibridização *in situ* para a localização dos mRNA codificantes para o IGF-I e IGF-II utilizou-se como sonda uma mistura de seis oligonucleótidos marcada com digoxigenina. Como controlos positivos usaram-se cortes histológicos de fígado adulto, no caso do IGF-I (Fig. 37), e de fígado fetal, no caso do IGF-II (Fig. 38). Como controlo negativo usaram-se lâminas onde a sonda não foi incluída na mistura de hibridização. Para confirmarmos que o sinal era proveniente da hibridização com o RNA e não com o DNA realizaram-se digestões com RNAase A. A digestão fez desaparecer o sinal o que demonstra a sua especificidade.

Realizou-se o estudo da expressão dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II durante o ciclo estral. Foi observada uma expressão semelhante para ambos os mRNAs durante todas as fases do ciclo, localizada essencialmente no estroma, no epitélio glandular e no epitélio luminal, embora com maior intensidade no miométrio (Fig. 39B,C).

Durante a gravidez, estudámos cortes histológicos correspondentes a três períodos de desenvolvimento: o período inicial pós-implantação, o período mediano e o período de crescimento da placenta. O período compreendido entre o dia 7 e o dia 10 é caracterizado pelo desenvolvimento da decidua no antimesométrio e seguidamente no mesométrio. Nos dias 11 e 12 o cone ectoplacentário inicia a invasão dos tecidos maternos. Do 13^o ao 16^o dia ocorre a formação da placenta hemocorial.

Dias 7-8

Durante o 7^o dia, a expressão para ambos os mRNAs encontrava-se em todo o corte sendo mais intensa na camada muscular circular e no epitélio luminal (Fig.40). O epitélio glandular também apresentava expressão. No antimesométrio o sinal apresentava-se mais intenso na zona decidual primária, ficando cada vez menos intenso à medida que nos afastávamos do lúmen uterino.

No 8^o dia, o padrão de expressão no antimesométrio permaneceu essencialmente igual ao 7^o dia para os dois mRNAs. No entanto, na camada muscular circular da zona antimesometrial verificou-se um decréscimo na positividade para o IGF-I. No mesométrio era possível observarem-se células de morfologia tipo fibroblástica e outras de forma arredondada. Ambos os tipos de células expressavam o mRNA codificante para o IGF-I sobretudo na zona central e com uma menor intensidade nas áreas laterais. Para o mRNA

codificante do IGF-II foi detectada uma fraca positividade nas células do estroma do mesométrio junto à camada muscular circular.



Figura 37- Corte transversal de fígado adulto (x200). A expressão do mRNA codificante para o IGF-I pode ser detectada nos hepatócitos.



Figura 38- Corte transversal de fígado fetal (x400). A expressão do mRNA codificante para o IGF-II pode ser detectada nos hepatócitos fetais.

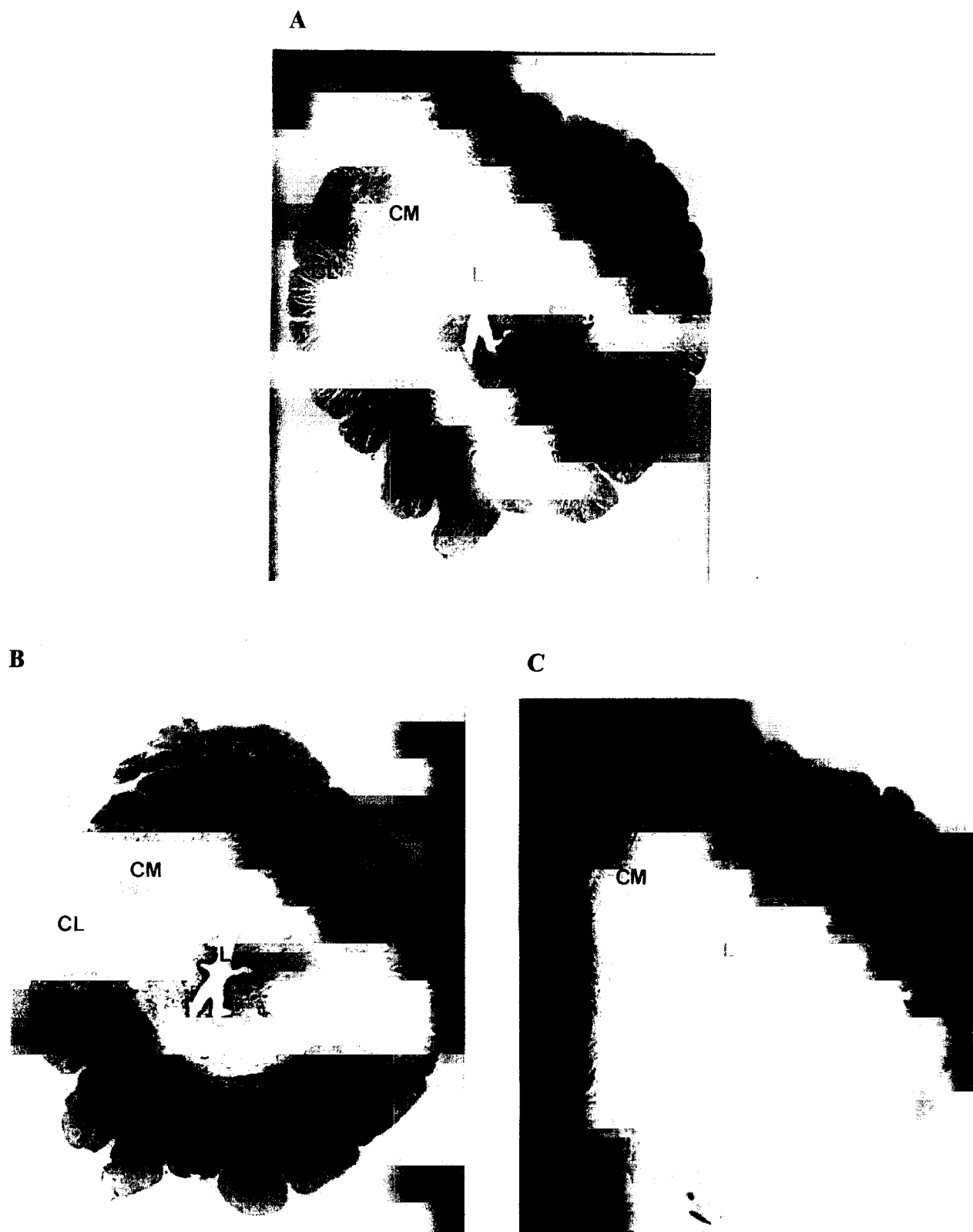


Figura 39- Corte transversal de útero em diestro (x 36). **(A)**- Hematoxilina e eosina; **(B)**- A expressão do mRNA codificante para o IGF-I pode ser detectada no epitélio do lúmen e nas camadas musculares circular e longitudinal. No estroma apresenta-se difusa; **(C)**- A expressão do mRNA codificante para o IGF-II é muito semelhante à do IGF-I. L- Lúmen uterino; CM- Camada muscular circular; CL- Camada muscular longitudinal.

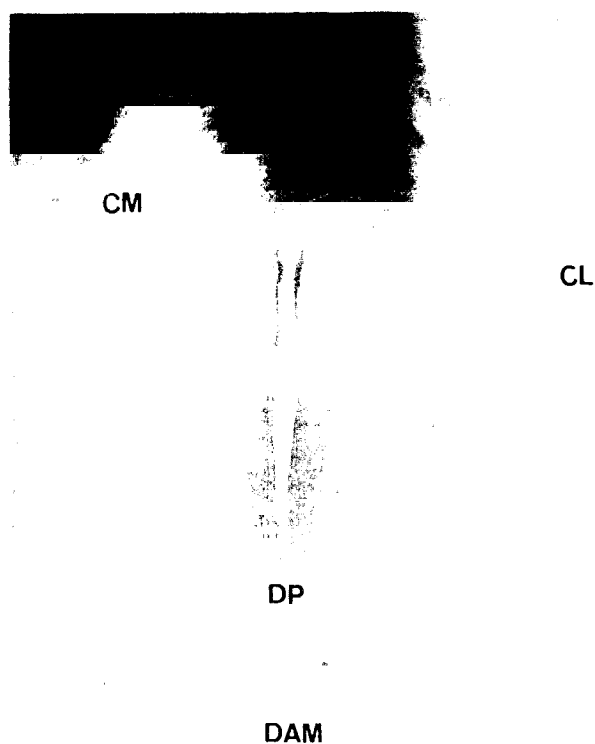


Figura 40- Corte transversal de útero no 7^o dia de gravidez (x 60). A expressão do mRNA codificante para o IGF-I pode ser detectada no epitélio do lúmen e nas camadas musculares circular e longitudinal. No estroma apresenta-se difusa, com um sinal mais intenso na zona decidual primária. DAM- Decidua antimesometrial; DP- Decidua primária; CM- Camada muscular circular; CL- Camada muscular longitudinal.

Dia 9

No 9^o dia, a camada muscular circular no antimesométrio era negativa para o mRNA codificante do IGF-I e fracamente positiva para o IGF-II. No mesométrio a camada muscular apresentava uma fraca expressão para ambos os mRNAs. Na decidua a expressão era intensa para o IGF-I (Fig.41), não sendo detectável para o IGF-II. A decidua antimesometrial era negativa para os dois mRNAs excepto para o IGF-II na região lateral e adjacente ao miométrio, na área da cápsula fibrinóide. Algumas células endoteliais dos sinusóides na área das células ricas em glicogénio eram positivas para o mRNA codificante do IGF-I.

Dia 10

No 10º dia, a decidua antimesometrial mostrou-se negativa para ambos os mRNAs, mantendo-se contudo a expressão do mRNA codificante para o IGF-II na cápsula fibrinoide. No antimesométrio a expressão para o mRNA codificante para o IGF-I era negativa na camada muscular circular e muito fraca para o IGF-II. A expressão na camada muscular do mesométrio era também muito fraca para ambos os factores com excepção de duas áreas do mesométrio lateral em que a expressão era fracamente positiva para o IGF-I e mais fraca para o IGF-II. Na decidua mesometrial a expressão era muito intensa para o mRNA codificante do IGF-I, sendo ainda mais intensa na decidua lateral. A expressão para o mRNA codificante do IGF-II não era detectável. Na área das células ricas em glicogénio, o endotélio em alguns sinusóides era positivo para ambos os mRNAs. Na decidua mesometrial, as células deciduais e as granulares mostraram-se positivas para o mRNA codificante para o IGF-I. No triângulo mesometrial as células fibroblásticas e granulares eram também positivas para o mRNA codificante para o IGF-I.



Figura 41- Corte transversal de útero no 9º dia de gravidez (x 40). A expressão do mRNA codificante para o IGF-I pode ser detectada na decidua mesometrial. A decidua antimesometrial não apresenta expressão. DM- Decidua mesometrial; DAM- Decidua antimesometrial; CF- Cápsula fibrinoide.

Dia 11

No 11º dia, a expressão para o mRNA codificante para o IGF-I era negativa na camada muscular circular em toda a sua extensão. A decidua lateral e a área das células ricas em glicogénio também não apresentavam marcação, à excepção das células endoteliais nos sinusóides. Na decidua mesometrial e triângulo mesometrial a expressão foi detectada nas células de morfologia tipo fibroblástica e redonda, particularmente junto à camada muscular circular. A expressão mais intensa foi encontrada no cone ectoplacentário (Fig.42). A expressão do mRNA codificante para o IGF-II não foi detectada no mesométrio nem na glândula metrial e o endotélio dos sinusóides era negativo. O cone ectoplacentário apresentava marcação.

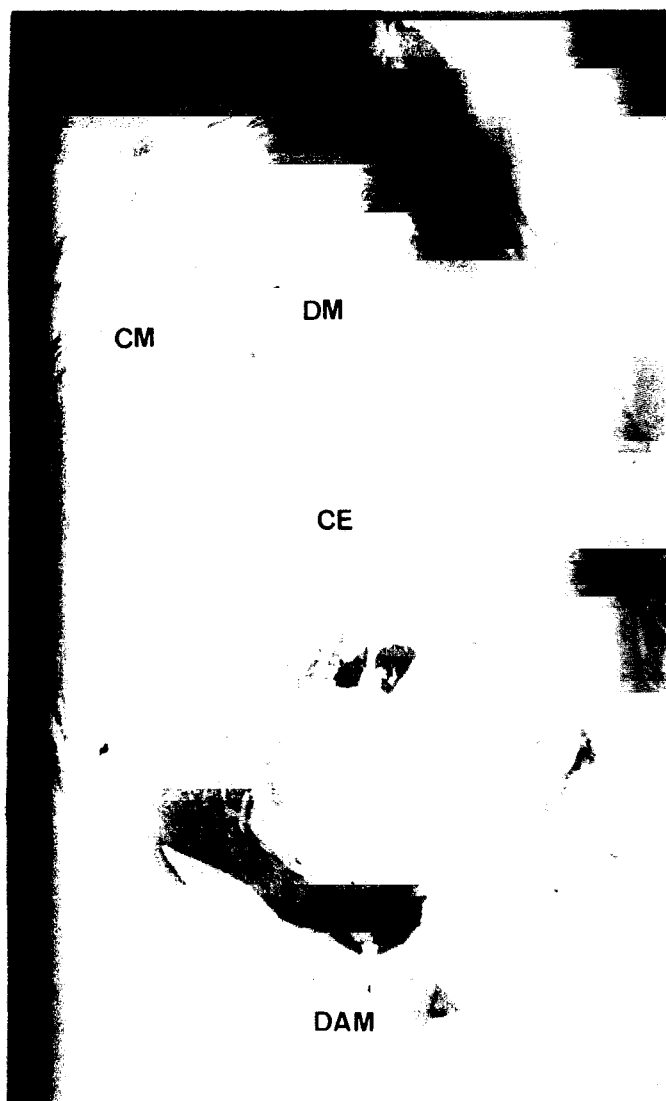


Figura 42- Corte transversal de útero no 11º dia de gravidez (x32). A expressão do mRNA codificante para o IGF-I é detectada mais intensamente na zona adjacente à camada muscular. A expressão é intensa nas células do trofoblasto do cone ectoplacentário. DM- Decidua mesometrial; DAM- Decidua antimesometrial; CM- Camada muscular circular; CE- Cone ectoplacentário

Dia 12

No 12º dia, a expressão para o mRNA codificante para o IGF-I na camada muscular circular era negativa. O sinal podia ser detectado na decidua lateral e no endotélio dos sinusóides (Fig. 43C). Na zona central da decidua mesometrial, as células deciduais e as células granulares apresentavam intensa positividade que era particularmente intensa nas que rodeavam a artéria central do mesométrio (Fig. 43B). Na glândula metrial as células de morfologia tipo fibroblástico e as células redondas expressavam intensamente o sinal. O sinal era intenso nas células do cone ectoplacentário. As células do trofoblasto endovascular mostravam-se positivas (Fig. 43B). A expressão para o mRNA codificante do IGF-II não foi detectada na camada muscular circular, decidua mesometrial ou camada muscular. As células do trofoblasto que invadiam os vasos sanguíneos e as células do cone ectoplacentário exibiam marcações positivas para este factor (Fig. 44).

Dia 13

No 13º dia não foi detectada a expressão do mRNA codificante para o IGF-I nas células deciduais na área dos sinusóides laterais, mas as células endoteliais continuavam a expressá-lo. A decidua do mesométrio, incluindo as células granulares da glândula metrial, apresentava expressão (Fig.45B). Na glândula metrial, a expressão era intensa nas células tipo fibroblásticas e nas células granulares da glândula metrial. Esta expressão também foi detectada nas células granulares e fibroblásticas que rodeiam os vasos sanguíneos e que formam arranjos perivasculares característicos (Fig.45C). A expressão deste mRNA era muito intensa no trofoblasto endovascular e em todas as células trofoblásticas da placenta (Fig.45B). O mRNA codificante para o IGF-II não era expresso nos tecidos maternos. No entanto, todas as células trofoblásticas da placenta apresentavam positividade, bem como o trofoblasto endovascular.

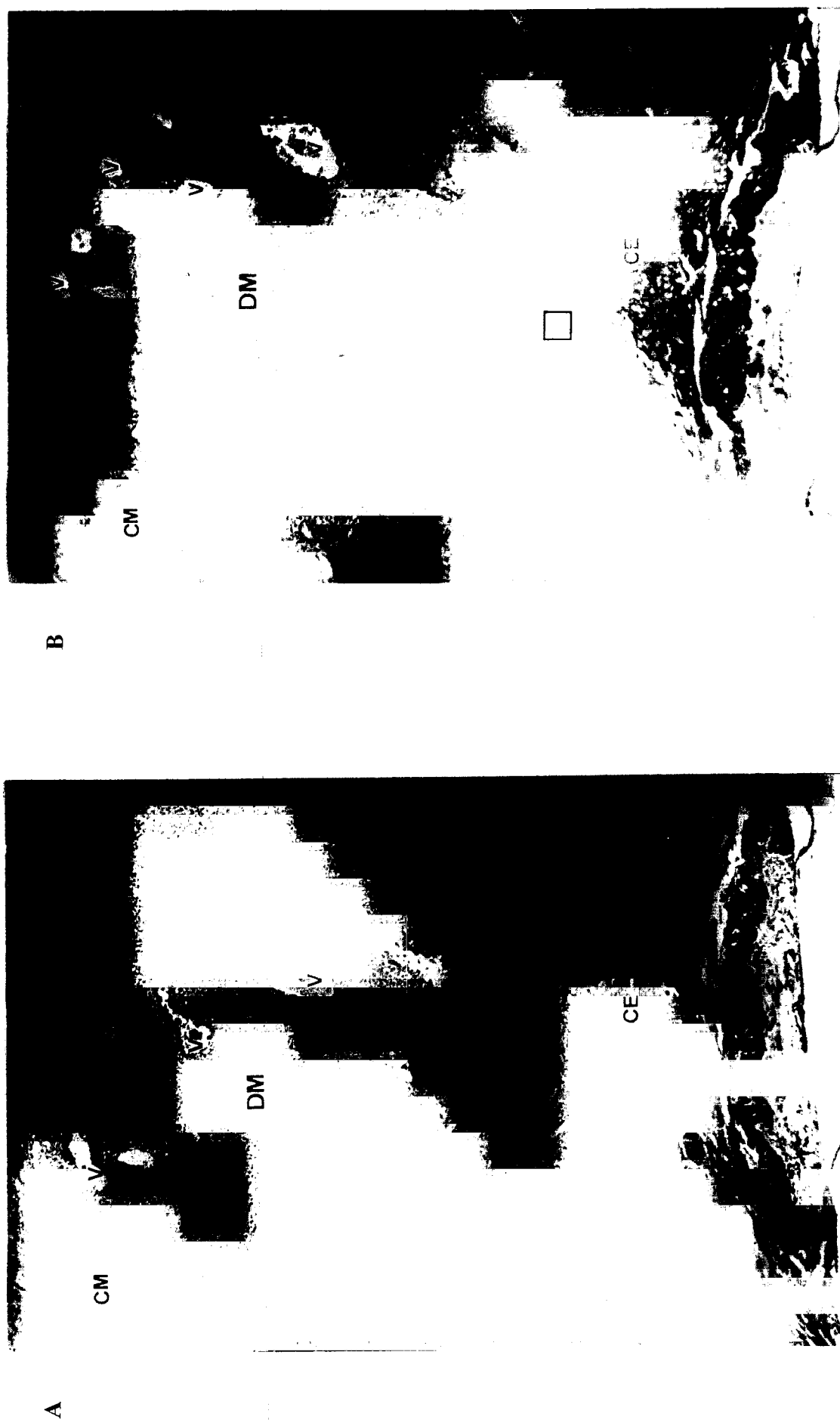


Figura 43 (A), (B)- Corte transversal de útero no 12.^o dia de gravidez (x 66). (A)- Hematoxilina/eosina. (B)- A expressão do mRNA codificante para o IGF-I é negativa na camada muscular circular. O sinal pode ser detectado na decidua mesometrial e no endotélio dos sinusóides. Observa-se uma forte positividade no cone ectoplacentário. A zona assinalada no quadrado está representada na Fig. 43C. DM- Decidua mesometrial; CM- Camada mesometrial; V- Vasos sanguíneos CE- Cone ectoplacentário.

C

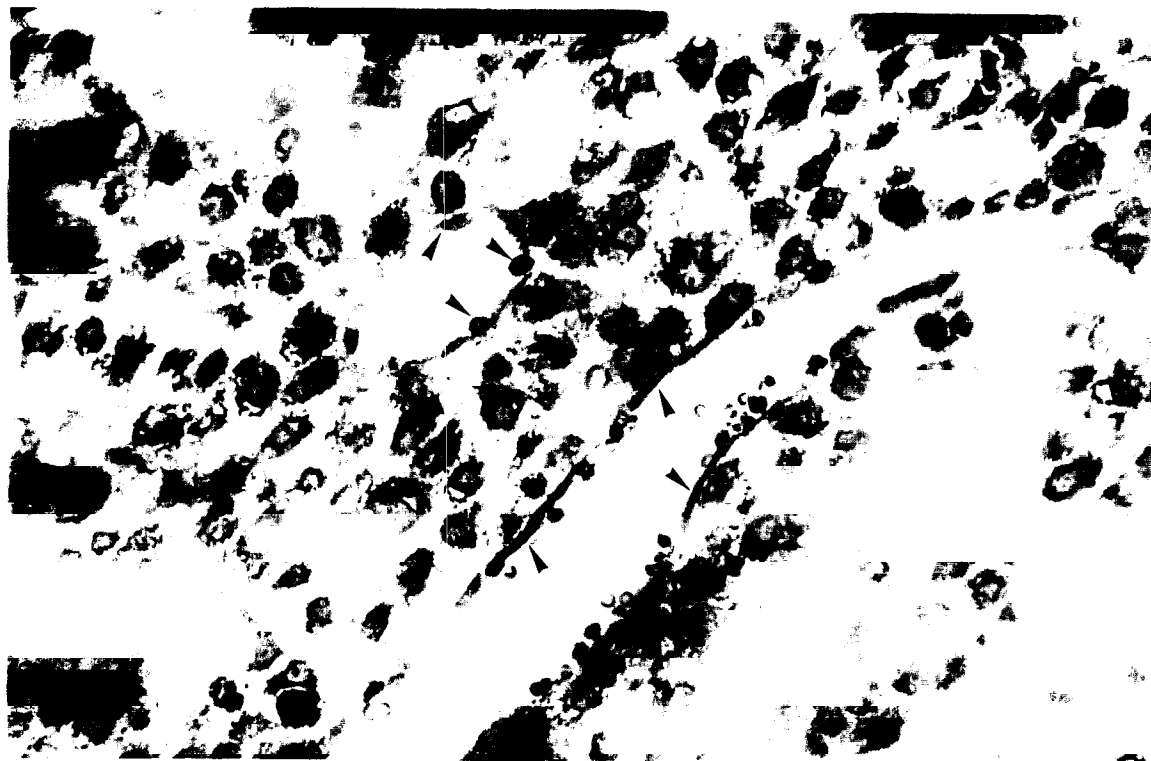


Figura 43 C- Corte transversal de útero no 12º dia de gravidez (x 200). Ampliação da Fig. 43B demonstrando a expressão do mRNA codificante para o IGF-I nas células deciduais e no endotélio dos sinusóides (setas).

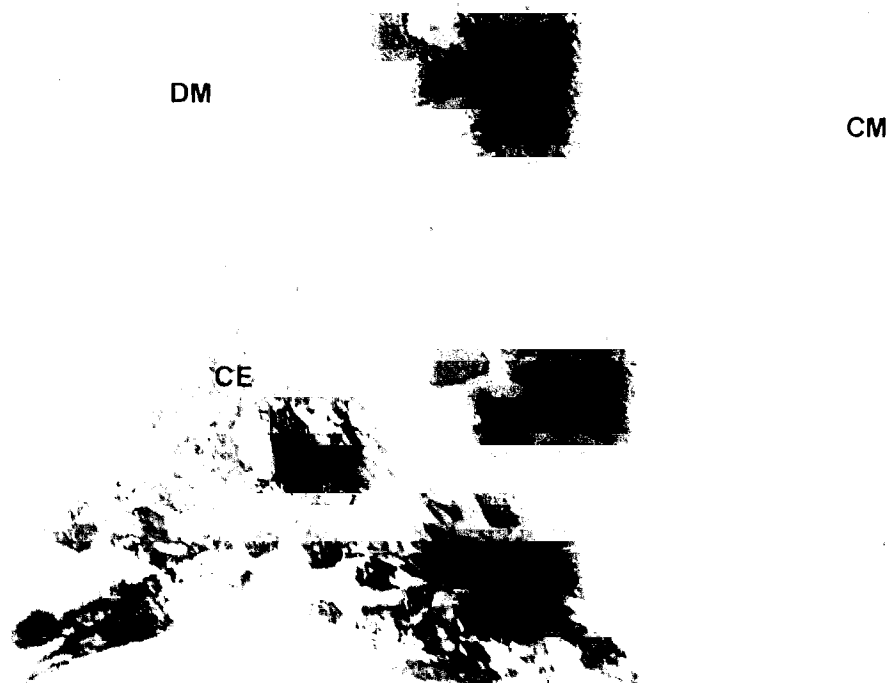


Figura 44- Corte transversal de útero no 12º dia de gravidez (x 76). A expressão do mRNA codificante para o IGF-II é intensa no cone ectoplacentário. DM- Decidua mesometrial; CM- Camada muscular circular; CE- Cone ectoplacentário.



Figura 45 A, B- Corte transversal de útero no 13º dia de gravidez (x 50). **(A)-** Hematoxilina/eosina; **(B)-** A expressão do mRNA codificante para o IGF-I é visível na zona central da decidua mesometrial e na glândula metrial. As células trofoblásticas da placenta apresentam intensa expressão, bem como o endotrofoblasto que invade a artéria central do mesométrio. A zona delimitada no quadrado está representada em C.
DM- Decidua Mesometrial; CM- Camada muscular circular; GM- Glândula metrial; V- Vasos sanguíneos.

C

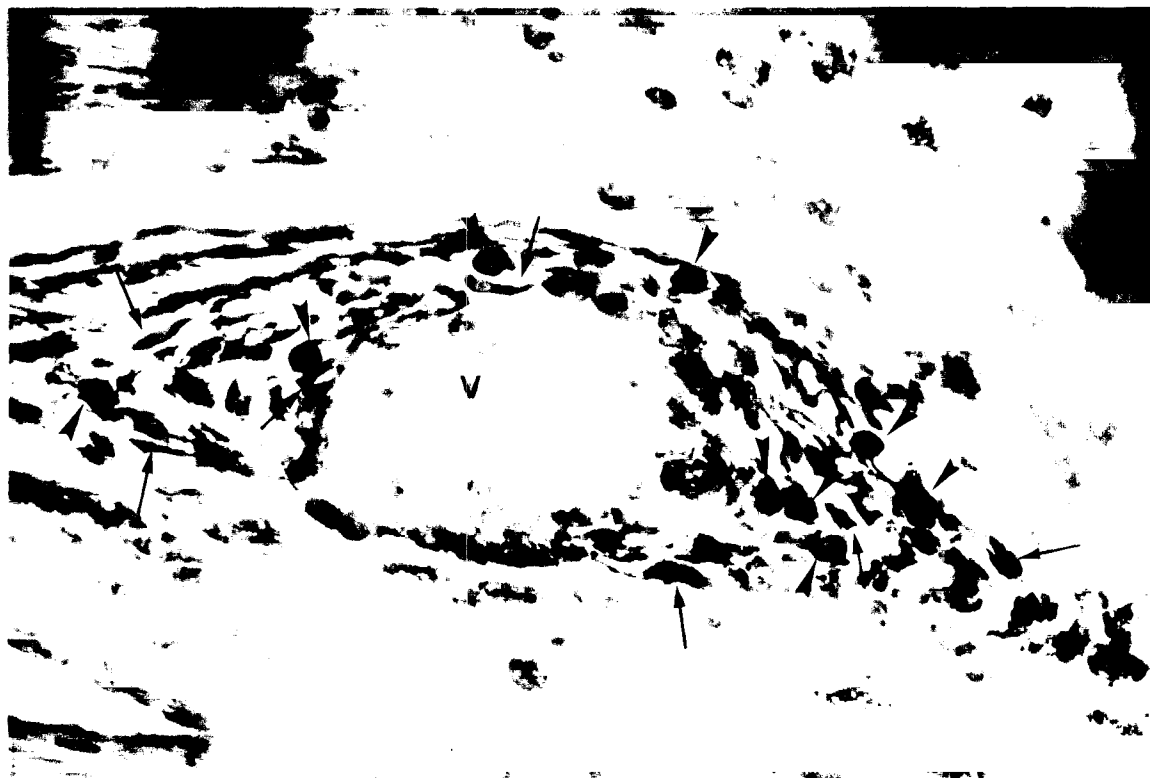


Figura 45 C- Corte transversal de útero no 13^o dia de gravidez (x400). Ampliação do quadrado representado na Fig.45B. Os vasos sanguíneos na glândula metrial estão rodeados por células fibroblásticas (→) e por células redondas da glândula metrial (▶). A expressão do mRNA do IGF-I é visível em ambos os tipos de células que formam os arranjos perivascularres. V- Vaso sanguíneo.

Dias 14-16

No 14º dia podem distinguir-se duas zonas definidas na placenta: a zona basal e o labirinto (Fig. 46A) e no 16º dia as populações trofoblásticas apresentam o seu máximo de diferenciação (Fig.47A,B). A zona basal localiza-se junto à decidua basal e é composta por três tipos de células: as células trofoblásticas basófilas, as células gigantes do trofoblasto e as células glicogénicas, com aspecto vacuolizado. As células gigantes têm um citoplasma grande, basófilo, e o núcleo tem vários e proeminentes nucléolos (Fig.47A). Estas células formam uma camada junto à decidua basal e interconectam-se para formar uma rede de canais onde circula o sangue materno de/e para o labirinto. Na zona basal não existem vasos fetais. A zona do labirinto possui o mesênquima fetal rodeado de 3 camadas de células trofoblásticas sendo a camada mais exterior a que está adjacente ao sangue circulante e a mais interior a que repousa sobre o mesênquima fetal (Fig.47B). As fronteiras entre camadas são muito ténues. O mesênquima fetal possui os vasos sanguíneos fetais onde circula sangue fetal. Exteriormente ao mesênquima, circula uma mistura de sangue fetal e materno nas lacunas. É na zona do labirinto que ocorrem as trocas materno-fetais.

Do 14º dia ao 16º dia, a expressão dos mRNAs codificantes para os IGFs ao nível dos tecidos maternos sofreu pequenas alterações. No entanto, ao nível da placenta com o desenvolvimento e diferenciação das diferentes populações trofoblásticas ocorreram importantes alterações de expressão.

No 14º dia, a expressão do mRNA codificante para o IGF-I era muito fraca na decidua lateral, mas as células endoteliais nos sinusóides continuavam positivas. Na decidua basal, as células decíduais e as células granulares da glândula metrial eram positivas mas as células granulares de maiores dimensões apresentavam menor intensidade de sinal. A expressão do mRNA codificante para o IGF-II nos tecidos maternos continuava negativa (Fig.46B). Na placenta, a expressão para os dois IGFs apresentava ligeiras diferenças de intensidade que se evidenciaram no dia 16.

No 16º dia, a expressão do mRNA codificante para o IGF-I deixou de ser detectada na decidua mesometrial. No entanto, na glândula metrial a sua expressão podia ainda ser detectada em grupos de células granulares que circundavam os vasos sanguíneos (Fig.48A). As células tipo fibroblásticas tornaram-se negativas. Os tecidos maternos continuavam negativos para o mRNA codificante do IGF-II (Fig.48B). Na placenta a expressão do mRNA codificante para o IGF-I era mais intensa na zona basal que no labirinto, sendo localizada nas células trofoblásticas vacuolizadas e nas células gigantes

do trofoblasto (Fig.48A,C). A expressão para o IGF-II apresentava maior intensidade na zona do labirinto, do que na zona basal, sobretudo nas células endoteliais dos capilares fetais (Fig.48B,D). Na zona basal, a expressão era menos intensa e estava associada com as células trofoblásticas vacuolizadas e as células gigantes do trofoblasto. A digestão com RNAase A (Fig.48E) resultou numa total ausência de expressão quer do mRNA codificante para o IGF-I quer do mRNA do IGF-II, o que demonstra a especificidade de sinal.

As tabelas 4 e 5 mostram as diferentes variações de expressão dos mRNAs codificantes para os dois factores ao longo da gravidez até ao 16º dia.



Figura 46- Corte transversal de útero no 14^o dia de gravidez (x 30). **(A)**- Hematoxilina e eosina; **(B)**- A expressão do mRNA codificante para o IGF-II não se observa nos tecidos maternos. É visível em toda a placenta. DB- Decidua basal; CM- Camada muscular circular; GM- Glândula metrial; V- Vasos sanguíneos; ZB- Zona basal; L- Labirinto.

A



B



Figura 47 A, B- Corte transversal de útero no 16^o dia de gravidez. Coloração com hematoxilina e eosina. (A)- Placenta: área da zona basal (x200). É possível observarem-se as células gigantes do trofoblasto (→) e as células glicogênicas vacuolizadas (➤). (B)- Placenta: área do labirinto (x200).

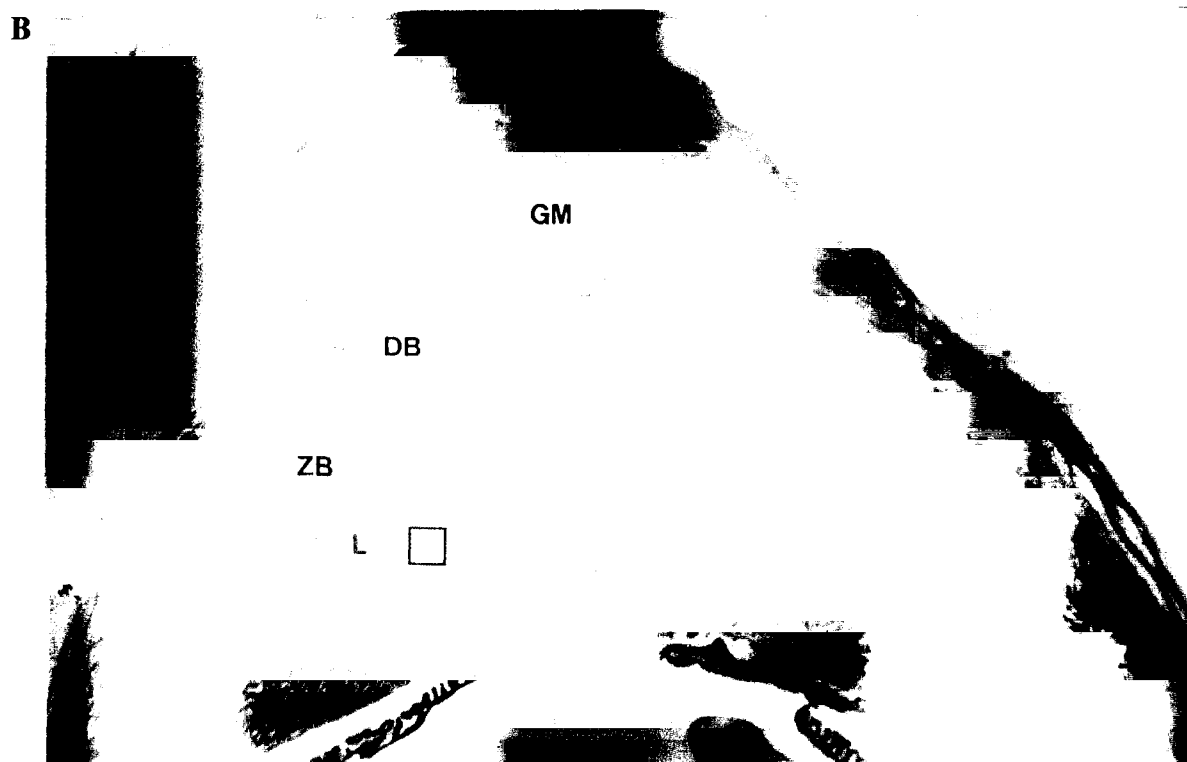
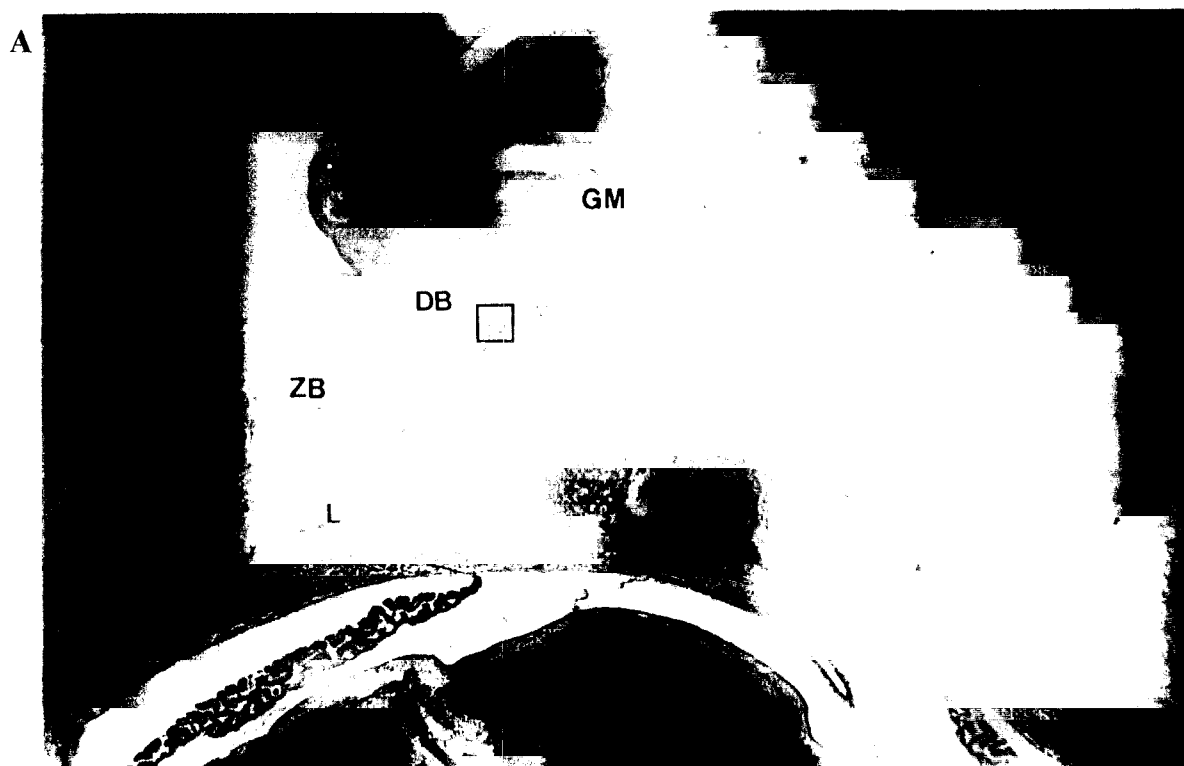


Figura 48 A, B- Corte transversal de útero no 16^o dia de gravidez (x32). **(A)-** Expressão do mRNA codificante para o IGF-I. Podem distinguir-se pequenos aglomerados de células positivas na glândula metrial. A decídua basal é negativa. A zona basal apresenta uma expressão mais intensa que o labirinto. **(B)-** Expressão do mRNA codificante para o IGF-II é mais intensa na zona do labirinto. Os quadrados delimitam as zonas demonstradas em (C) e (D). GM- Glândula metrial; DB- Decídua basal; ZB- Zona basal; L- Labirinto.

C



D

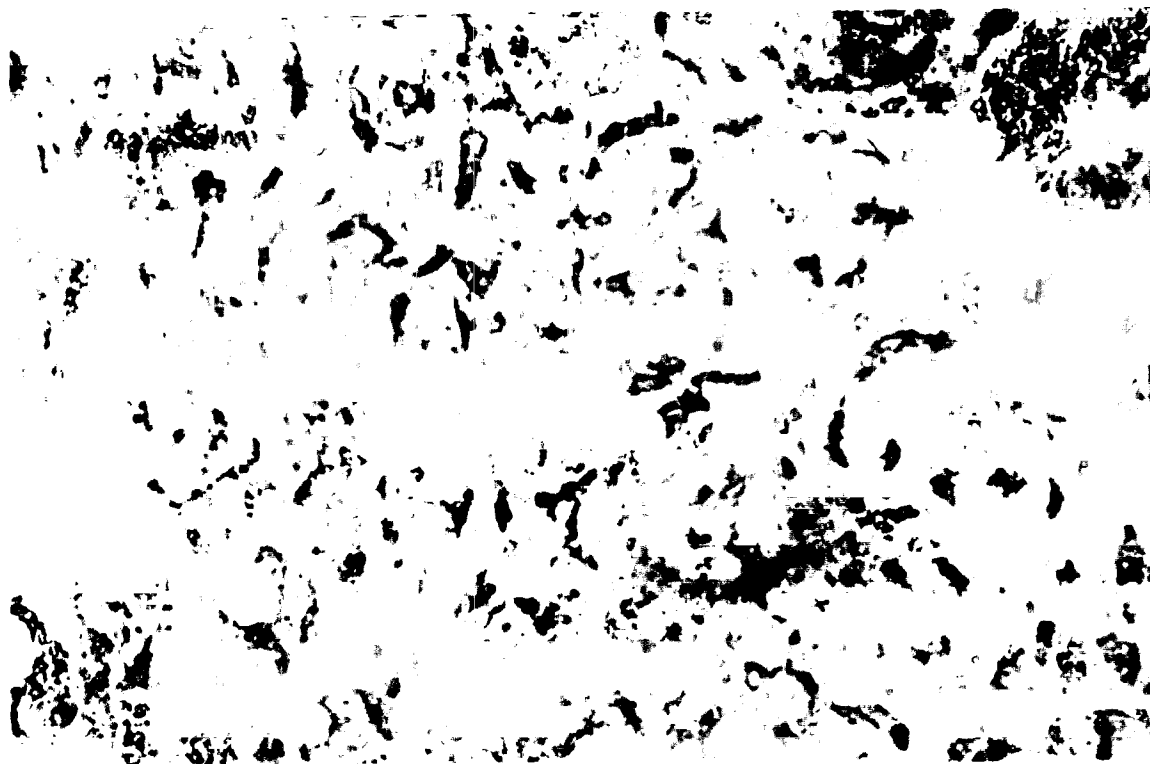


Figura 48 C, D- Ampliações de (A) e (B) (x200). (C)- A expressão do mRNA codificante para o IGF-I é intensa nas células gigantes do trofoblasto (→) e nas células trofoblásticas vacuolizadas (➤). (D)- Expressão do mRNA codificante para o IGF-II é intensa na zona do labirinto especialmente no endotélio dos capilares fetais.

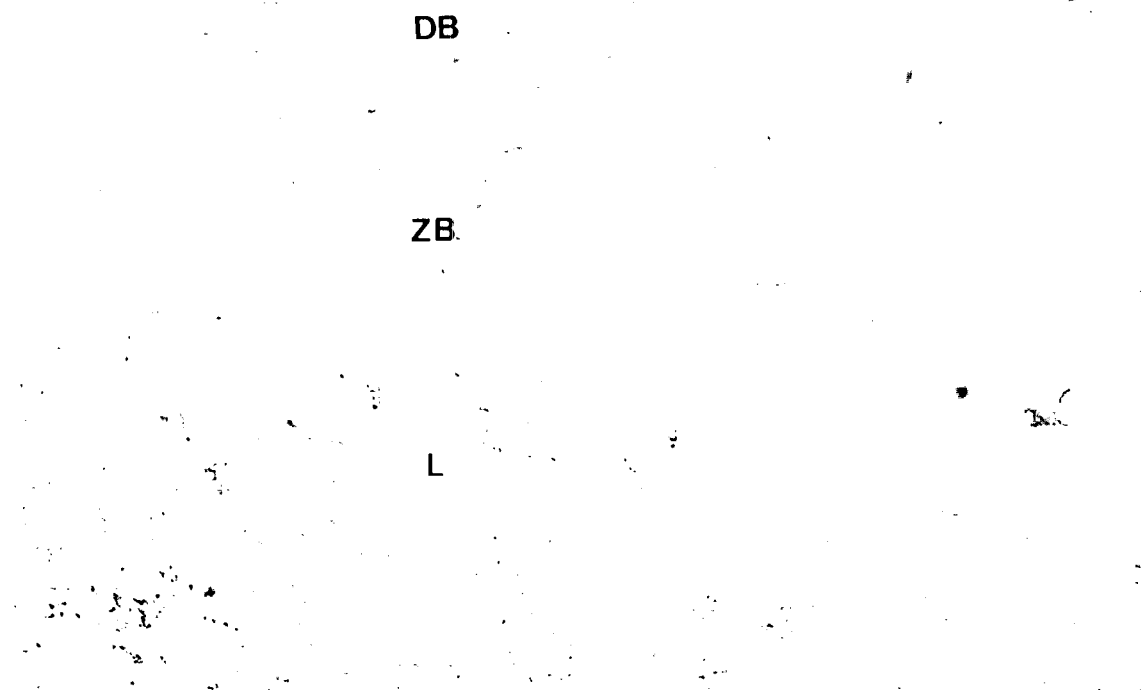
E

Figura 48E- Corte transversal de útero no 16^o dia de gravidez (x80) digerido com RNase A. A digestão eliminou a expressão para ambos os mRNAs. DB- Decidua basal; ZB- Zona basal; L- Labirinto.

Tabela 4. Expressão do mRNA codificante para o IGF-I no útero durante a gravidez

	Dia de gravidez									
	7	8	9	10	11	12	13	14	16	
DAM	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	
DM	+	+	++	++	+	+(ZC)	+(ZC)	+	-	
CM-dam	++	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
CM-dm	++	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
TM/GM	+	+	++	++	++	++	++	+	+(CG)	
CE					++	++				
ZL							++	+	+/-	
ZB							++	++	++	

+/- sinal fraco mas de maior intensidade que o "background"; - sinal de intensidade igual ao "background"; + sinal de intensidade superior ao "background".

Abreviaturas: **DAM**- Decidua antimesometrial ; **CM-dam**- Camada muscular circular no polo antimesometrial; **DM**- Decidua mesometrial; **ZC**- Zona central da decidua mesometrial; **CM-dm**- Camada muscular circular no polo mesometrial; **TM/GM**- Triângulo mesometrial/Glândula metrial; **CE**-Cone ectoplacentário; **ZL**-Zona do labirinto da placenta; **ZB**- Zona basal da placenta.; **CG**- Células granulares da glândula metrial.

Tabela 5. Expressão do mRNA codificante para o IGF-II no útero durante a gravidez

	Dia de gravidez									
	7	8	9	10	11	12	13	14	16	
DAM	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
DM	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
CM-dam	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
CM-dm	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
TM/GM	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
CE					+	+				
ZL							++	++	++	
ZB							+	+	+	

+/- sinal fraco mas de maior intensidade que o "background"; - sinal de intensidade igual ao "background"; + sinal de intensidade superior ao "background".

Abreviaturas: **DAM**- Decidua antimesometrial ; **CM-dam**- Camada muscular circular no polo antimesometrial; **DM**- Decidua mesometrial; **CM-dm**- Camada muscular circular no polo mesometrial; **TM/GM**- Triângulo mesometrial/Glândula metrial; **CE**-Cone ectoplacentário; **ZL**-Zona do labirinto da placenta; **ZB**- Zona basal da placenta.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

1. Estudos estruturais

A DAP é uma glicoproteína sintetizada pelo tecido decidual do rato no início da gravidez, inicialmente detectada e isolada por Bell (1979a,b). Este investigador descreveu a DAP como sendo uma glicoproteína com mobilidade electroforética e identidade imunológica semelhantes à AMF, a α 2M circulante de fase-aguda de origem hepática. Posteriormente, Teixeira e O'Grady (1992) realizaram um estudo comparativo das propriedades físico-químicas da DAP e da AMF. Estes autores, determinaram os seus pesos moleculares, pontos isoeléctricos, composição em aminoácidos e açúcares neutros e realizaram, ainda, estudos com anticorpos policlonais que permitiram confirmar a identidade imunológica existente entre a DAP e a AMF. Hayashida e col. (1986) estudaram a expressão da α 2M na inflamação e gravidez a nível do RNA e, embora não apresentando resultados conclusivos, pois não clonaram nem sequenciaram o gene, sugeriram que o mesmo gene respondia a dois estados fisiológicos diferentes. De modo a determinar se de facto estas proteínas possuíam homologia a nível da sequência de DNA, realizou-se um estudo das zonas de DNA correspondentes às "bait region" da DAP e AMF. Esta zona funcional da proteína não apresenta homologia entre os membros da família das α -macroglobulinas, sendo a restante sequência filogeneticamente conservada. A sequenciação da zona de DNA correspondente à "bait region" da DAP mostrou uma sequência idêntica à da AMF. No entanto, apesar da homologia observada na região codificante para as "bait region" das duas proteínas, não podemos concluir que exista uma global coincidência de sequências entre a DAP e a AMF, dado que estas proteínas possuem elevado peso molecular, da ordem dos 800 kDa e a região sequenciada corresponde apenas a 350 pb. De qualquer modo, pensamos que numa proteína de tão elevado peso molecular, se deveria começar por estudar a zona de DNA que se espera ser de menor homologia e que, neste caso, é a zona correspondente à "bait region".

Durante o nosso trabalho verificámos que em PAGE nativo a mobilidade electroforética das duas proteínas apresentava uma ligeira diferença, sendo a da AMF ligeiramente superior à da DAP. Como referido anteriormente, existe uma certa

discrepância entre os valores de peso molecular apresentados para a AMF pelos diversos autores. No entanto, nenhum deles realizou um estudo comparativo entre as duas formas de $\alpha 2M$ ou se aperceberam dessa diferença de mobilidade. No estudo comparativo entre a AMF e a DAP, realizado por Teixeira e O'Grady (1992), foi demonstrado que em geis de poliacrilamida os pesos moleculares das subunidades, obtidos após redução, eram de cerca de 170 kDa e as proteínas apresentavam, em PAGE nativo, um peso molecular aparente de 820 kDa. Contudo, este valor foi obtido por extrapolação, dado que o marcador de maior peso molecular disponível era a $\alpha 2M$ humana (725 kDa). Nos nossos resultados, a pequena diferença de mobilidade electroforética entre a DAP e a AMF poderia indicar possíveis diferenças estruturais, já que em PAGE nativo a mobilidade electroforética está dependente, não só do peso molecular, mas também da carga das proteínas. Por outro lado, quando se realizavam incubações de tecido decidual em meio de cultura, a forma secretada da DAP apresentava uma mobilidade electroforética intermédia entre a AMF e a DAP tecidual. Assim, determinámos os pontos isoeléctricos das várias formas de $\alpha 2M$ por focagem isoeléctrica. A determinação do ponto isoeléctrico (pI) para a forma tecidual da DAP foi de 5,2, o pI da forma secretada era 5,0 e o pI da AMF era de 4,85. Estes valores mostraram-se concordantes com os determinados por Teixeira e O'Grady (1992). A diferença de pontos isoeléctricos traduz uma heterogeneidade de cargas que poderá explicar a diferente mobilidade electroforética observada entre as diversas formas de $\alpha 2M$ em PAGE nativo. A diferença de cargas pode ser atribuída à diferente composição em açúcares das duas glicoproteínas, nomeadamente em ácido siálico também responsável pela electronegatividade das glicoproteínas. De facto, Teixeira e O'Grady (1992) demonstraram que estas glicoproteínas apresentavam uma diferente composição em hidratos de carbono. Ao realizármos uma digestão das várias formas de $\alpha 2M$ com a neuraminidase verificámos, por focagem isoeléctrica, uma aproximação dos valores de pI das formas digeridas da AMF e da forma secretada da DAP para valores de pI semelhantes aos da forma intracelular da DAP. Nesta última, a digestão não alterou o pI. Em PAGE nativo os produtos da digestão apresentavam mobilidades electroforéticas muito semelhantes e próximas da mobilidade apresentada pela forma da DAP intracelular.

A existência de duas formas de DAP foi demonstrada por Teixeira e O'Grady (1992). A forma extracelular de pI 4,97, existente no soro e tecido decidual, e a forma intracelular com pI 5,2 que foi detectada somente no tecido decidual. Experiências realizadas por Schreiber e col. (1979) com a transferrina, isolada do fígado e do soro, demonstraram a presença de uma forma no fígado e de duas formas no soro. A explicação dada para este resultado foi o diferente grau de sialização das diferentes formas, o qual originava diferentes pontos isoeléctricos. Andus e col. (1983), utilizando culturas de hepatócitos de rato, demonstraram para a $\alpha 2M$ a existência de uma forma intracelular que não continha ácido siálico e de uma forma secretada. A forma intracelular podia ser obtida após homogeneização das células e a extracelular a partir do meio de cultura. No homogeneizado, podiam ser encontradas as duas formas, embora no meio de cultura só existisse a forma secretada. Esta forma secretada exibia a mesma mobilidade que a $\alpha 2M$ purificada do plasma e era susceptível ao tratamento com neuraminidase. A digestão com neuraminidase originava uma $\alpha 2M$ de peso molecular mais aproximado da forma intracelular. Comparando os resultados destes autores com os nossos resultados obtidos com a digestão pela neuraminidase, é provável que um fenómeno semelhante possa ocorrer durante a secreção da DAP.

A cadeia oligossacarídica é um componente importante nas glicoproteínas e pode afectar muitas das suas propriedades, como a susceptibilidade proteolítica, a actividade biológica, a imunogenicidade e o tempo de semi-vida. A presença de ácidos siálicos tem influência nas propriedades físicas e biológicas das glicoproteínas, estando a solubilidade e o tempo de semi-vida aumentados na presença de ácido siálico. A remoção do ácido siálico da gonadotrofina coriónica humana (hCG) resulta na perda de actividade biológica sem alteração da imunoreactividade ou ligação a receptores (Kalyan e Bahl, 1983) e numa diminuição da semi-vida plasmática. Por outro lado, a α -fetoproteína humana apresenta várias formas com heterogeneidade de cargas devido a diferenças no conteúdo em ácido siálico (Smith e Kelleher, 1980). A forma isolada do fígado fetal tem uma maior actividade de imunoregulação do que a isolada de soro de doentes com hepatoma. O diferente conteúdo em ácido siálico da AMF poderá permitir um maior tempo de semi-vida em circulação (esta é de facto uma proteína plasmática) e no caso da DAP poderá afectar propriedades biológicas que não as estudadas.

2. Ligação de citocinas às proteínas

Na espécie humana, a $\alpha 2M$ possui capacidade de ligação de vários factores de crescimento e citocinas, quer na sua forma nativa ou "slow" quer na sua forma "fast" após ligação com proteases. O comportamento da $\alpha 2M$ na ligação varia conforme a citocina usada e a presença de proteases. A ligação de certos ligandos pode ocorrer especificamente com a forma "fast", como no caso da interleucina-1 β (Borth e Luger, 1989), ou processar-se durante a passagem da forma "slow" à forma "fast" na presença de enzimas como no caso da insulina (Chu e col., 1991), ou, ainda, não depender de proteases, isto é, verificar-se a ligação à forma nativa da proteína, como no caso da IL-6 (Matsuda e col., 1989) e da IL-2 (Legrès e col., 1995).

Uma vez que a $\alpha 2M$ do rato apresenta uma semelhança estrutural com a humana e é um membro da família das $\alpha 2$ -macroglobulinas, levantamos a hipótese de que a $\alpha 2M$ do rato poderia ligar também citocinas e factores de crescimento. Seria assim importante verificar o comportamento desta proteína em relação a factores de crescimento e citocinas existentes no ambiente gestacional. Os resultados obtidos no nosso estudo *in vitro*, demonstraram propriedades semelhantes às exibidas pela $\alpha 2M$ humana. A ligação da IL-6 não estava dependente da presença de proteases. De facto, a ligação ocorria quer com a forma nativa da $\alpha 2M$ quer com a forma "fast" resultante da acção das proteases. Esta ligação apresentava especificidade já que concentrações crescentes de IL-6 não marcada, eram capazes de deslocar da ligação a forma radioactiva. Foi assim demonstrado a ligação da IL-6 às duas formas de $\alpha 2$ -macroglobulina, a hepática circulante e a decidual, com a mesma intensidade e especificidade. A diferente origem tecidular não parece afectar as propriedades de ligação das duas proteínas à IL-6. A $\alpha 2M$ humana e a $\alpha 2M$ do rato parecem, deste modo, partilhar para além das propriedades inibitórias de proteases (Teixeira e col., 1991), os mesmos tipos de ligações a ligandos. Nos hepatócitos a IL-6 é indutora da síntese de $\alpha 2M$ e seria interessante estudar se o mesmo poderá acontecer a nível decidual.

A IL-6 é produzida por células imunocompetentes, fibroblastos e células endoteliais promovendo a proliferação e diferenciação celulares, processos que são importantes durante a decidualização e angiogénese. Por outro lado, a IL-6 secretada pela

decidua poderá funcionar sinergicamente com outros factores e citocinas produzidos na interface materno-fetal de forma a assegurar a sobrevivência fetal e um normal desenvolvimento placentário. De facto, Kameda e col. (1990) demonstraram a presença de IL-6 nas células trofoblásticas da placenta humana sobretudo no sincitiotrofoblasto e Kauma e col. (1993) verificaram que o core das vilosidades coriônicas também produz IL-6, o que poderá indicar que esta citocina com as suas múltiplas propriedades imunoreguladoras poderá desempenhar funções imunológicas nas interacções materno-fetais.

O principal produto secretado pelo tecido decidual humano é a IGFBP-1, uma proteína que liga o IGF-I. Este factor de crescimento foi detectado em tecidos gestacionais de diversos animais e no Homem, sendo um factor importante para o bom desenvolvimento fetal. Dado que a DAP é o principal produto de decidua do rato, decidimos verificar se esta glicoproteína, tal como a IGFBP-1, ligava o IGF-I. Neste estudo demonstramos a ligação do IGF-I marcado com ^{125}I às duas formas de $\alpha 2$ -macroglobulina, a hepática e a decidual, o que poderá indicar para a $\alpha 2\text{M}$ decidual uma certa similaridade de funções com a IGFBP-1 humana. Ao estudarmos a ligação do IGF-I à $\alpha 2\text{M}$ do rato verificamos um comportamento semelhante ao descrito por Chu e col. (1991) em relação à ligação da insulina à $\alpha 2\text{M}$ humana. De facto, a ligação do IGF-I à $\alpha 2\text{M}$ quer na sua forma hepática quer decidual, necessitava da presença de proteases. Utilizando plasma humano (as propriedades de ligação do IGF-I à $\alpha 2\text{M}$ nunca tinham sido antes avaliadas), observamos que o mesmo acontecia com a $\alpha 2\text{M}$ humana. Ao contrário do que verificamos para a IL-6, a ligação do IGF-I dá-se muito fracamente com a proteína na forma nativa ou na forma "fast". As condições óptimas de ligação existem quando o factor está presente durante a transformação conformacional que ocorre por reacção com as proteases. Este facto poderá significar que os locais de ligação ao IGF-I são gerados transitoriamente durante o processo de alteração conformacional da proteína causada por reacção com a tripsina. Durante a clivagem da "bait region" e subsequente ruptura da ligação tioéster, formar-se-á uma ligação amida entre o grupo ϵ -amino de uma lisina do IGF-I e o grupo γ -carbonilo do resíduo de glutamina do tioéster. Durante esta ligação ocorrerá por certo competição entre a tripsina e o IGF-I para o grupo carbonilo, já que

proteínases e outros peptídeos não proteolíticos contendo aminas, podem ser incorporados no tioéster tal como demonstrado por Sottrup-Jensen e col. (1981).

A maior intensidade de ligação com o IGF-I era verificada em condições que favoreciam a formação de complexos binários $\alpha 2M$ /tripsina (1:1). Esta observação está de acordo com a reacção e possível ligação covalente do IGF-I com o resíduo de glutamina que ficou livre após a ruptura da ligação tioéster. A tripsina após clivagem da "bait region" liga-se a este resíduo (Salvensen e col., 1981) e somente uma concentração não saturante de tripsina favorecerá a reacção IGF-I/glutamina. De facto, em condições fisiológicas, a $\alpha 2M$ está sempre em excesso em relação às proteases mesmo nos locais de inflamação (Borth e col., 1986) e complexos binários poderão formar-se favorecendo, desta forma, a ligação de citoquinas. O mesmo tipo de comportamento foi já descrito para o TGF β 1. A ligação deste factor de crescimento está dependente da forma "fast" e a intensidade de ligação varia com a estequiometria dos complexos $\alpha 2M$ -protease. Complexos binários de tripsina, quimotripsina e elastase têm maior capacidade de ligação do TGF β 1 que a forma nativa. Quando a $\alpha 2M$ está saturada formando complexos ternários (2:1) a ligação do TGF β 1 permanece idêntica ou diminuída em relação à forma nativa (Hall e col., 1992).

A ligação entre a $\alpha 2M$ e o IGF-I era estável após acção do SDS e em condições de redução com o β -mercaptoetanol indicando que o IGF-I estava assim especificamente incorporado. O IGF-I poderá exercer um ataque nucleofílico às pontes tioéster expostas após ruptura, com formação de uma ligação γ -glutamilamida. Este mecanismo é semelhante não só ao proposto por Chu e col. (1991) na interacção da $\alpha 2M$ humana com a insulina, mas também ao processo que ocorre na ligação covalente da $\alpha 2M$ a proteases.

Vários estudos têm descrito valores de 0,1-1 nM para afinidade de interacção do IGF-I com o seu receptor. O valor de 0,9 μM que encontramos nos nossos resultados para o I_{50} (metade da inibição máxima de ligação), parece sugerir uma baixa afinidade de interacção entre a DAP e o IGF-I. No entanto, Chu e col. (1991) nas suas experiências de ligação da $\alpha 2M$ à insulina encontraram para as cadeias A e B da insulina valores de I_{50} de 73 μM e de 46 μM respectivamente. Por outro lado, a concentração da DAP na totalidade do tecido decidual no dia 12 de gravidez foi estimada como sendo 8-9 μM , existindo uma elevada produção em áreas específicas da decidua, conforme demonstramos nos nossos

estudos de localização. As concentrações, *in vivo*, poderão assim ser elevadas e nos locais de interacção a DAP poderá efectivamente competir com o receptor do IGF-I para o ligando livre.

Os resultados obtidos com o plasma normal demonstraram a ligação do IGF-I à α 1-macroglobulina (α 1M), outra α -macroglobulina circulante, por mecanismo semelhante ao da ligação com a α 2M. A α 1M é um membro da família das α -macroglobulinas embora no rato, ao contrário da α 2M, não seja uma proteína de fase aguda. De qualquer modo, quer a α 1M quer a α 2M são inibidores de proteases que apresentam o mesmo mecanismo de inibição e contêm a ligação tioéster. Esta ligação parece ser, de acordo com os nossos resultados, fundamental para o mecanismo envolvendo a ligação covalente do ligando. Seria então de esperar, como verificamos, propriedades de ligação semelhantes. Mais ainda, utilizando plasma humano, verificamos que uma proteína de mobilidade electroforética semelhante à α 2M humana exibia também propriedades de ligação ao IGF-I. A α 2M humana é também uma proteína contendo a ligação tioéster. Esta observação reforça a hipótese de que a ligação tioéster desempenha um papel fundamental na ligação deste ligando a este tipo de proteínas.

Durante o fraccionamento do plasma de fase aguda na coluna de DEAE cellulose observou-se a ligação do ^{125}I -IGF-I a outros componentes do plasma, para além das proteínas α 1M e α 2M. Estes componentes poderão ser as clássicas proteínas existentes no plasma que ligam os IGFs, as IGFBPs (Moses e col., 1976).

Ao contrário do que verificamos com a ligação do IGF-I, a ligação da IL-6 à α 2M ocorre quer nas formas nativas das proteínas quer nas formas "fast" resultantes da acção das proteases. Estes factos demonstram que os mecanismos de ligação para estes factores são diferentes e que a α 2M apresenta especificidade de ligação. A importância fisiológica das interacções entre a α 2M e os diversos factores de crescimento e citoquinas não é totalmente evidente. As diferenças nos mecanismos de ligação existentes para os vários ligandos podem reflectir-se em diferentes propriedades funcionais *in vivo*. O tipo de ligação entre a α 2M e o seu ligando pode determinar a via seguida por este, após ligação aos receptores de membrana da α 2M, nas vias de interiorização celular endocíticas/lisossómicas, tal como sugerido por Borth (1992). Assim, factores ligados de forma irreversível deverão ser interiorizados juntamente com a α 2M e sofrer proteólise,

enquanto que os peptídeos ligados reversivelmente podem dissociar-se da $\alpha 2M$ e actuar intracelularmente. A $\alpha 2M$ poderá funcionar como molécula de "limpeza" eliminando citoquinas já não desejadas ou por outro lado, proteger as citoquinas contidas no seu interior mantendo a sua actividade e impedindo os ataques de proteases, como no caso da IL-6, IL-1 β , IL-2 e TGF β 1. A $\alpha 2M$ ligando o IGF-I covalentemente na presença de proteases, que poderão ser de origem materna ou trofoblástica, poderá actuar como inibidor da acção do IGF-I, enquanto que no caso da IL-6, que se liga não covalentemente, funcionará como "carrier" permitindo a sua disponibilização para uso celular.

3. Localização espacial e temporal do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ no útero

A expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ é específica em termos de período de gravidez, tipo de células e localização tecidular como foi demonstrado com os resultados da hibridização *in situ*. Estes resultados confirmam a presença do mRNA que codifica para a $\alpha 2M$ no tecido decidual detectado anteriormente por Hayashida e col. (1986) e Thomas (1993). Contudo estes autores não estudaram a evolução da expressão ao longo da gravidez nem estabeleceram a ligação entre tipo celular e expressão nos diversos tecidos maternos. O mRNA codificante para a $\alpha 2M$ não é expresso em úteros não grávidos, donde se conclui que esta proteína deverá exercer um papel fundamental na gravidez. Por outro lado, o mRNA da $\alpha 2M$ é sintetizado no deciduoma o que permite concluir que a presença do embrião não é fundamental para a sua síntese.

O início da síntese do mRNA da $\alpha 2M$ no 8º dia e a sua continuação até ao final da gravidez, está correlacionado com os resultados observados por Bell nos seus estudos de síntese da DAP *in vitro*, utilizando explantes de útero (Bell, 1979a, Bell 1979b). A ausência de expressão detectável desde o 5º dia, dia da implantação, até ao 8º dia, indica que a produção de mRNA não está associada com a decidualização, que acontece no antimesométrio durante esse período. Embora a implantação do embrião ocorra nesta região no 5º dia não se dá neste local uma invasão dos tecidos, já que o embrião cresce no sentido do mesométrio formando-se uma cripta ou câmara de implantação no antimesométrio (Welsh e Enders, 1983). O facto de as células no antimesométrio não

expressarem $\alpha 2M$ pode ser um reflexo da acção não invasiva do embrião durante esta fase de implantação, não sendo necessário, deste modo, a produção de inibidores de proteases. No entanto, no 9º e 10º dias foi detectada a expressão do mRNA no antimesométrio numa camada de células entre os limites das células decíduais do antimesométrio e as células do estroma não diferenciadas, adjacentes ao miométrio. Esta camada (cápsula fibrinóide) forma a zona de ruptura entre o estroma não diferenciado e as células decíduais do antimesométrio, estando associada com o estiramento e adelgaçamento da decidua e do miométrio, o que reflecte o crescimento do feto e o aumento do volume uterino. Possivelmente, a expressão da $\alpha 2M$ nesta camada é inicialmente induzida pelo estiramento, agressão local e involução celular da decidua do antimesométrio, já que a $\alpha 2M$ é uma proteína envolvida nos processos inflamatórios e de remodelação tecidual.

Desde o dia 8 ao dia 10 a expressão do mRNA é detectada na decidua lateral na área das células ricas em glicogénio, local onde se dá a drenagem do sangue materno do local de implantação para os sinusoides venosos (Enders e Welsh, 1993). Durante o desenvolvimento desta área ocorre a proliferação do endotélio. Embora se observe marginalização de polimorfonucleares, estes não migram através do endotélio para a área lateral da decidua, que é positiva para o mRNA codificante da $\alpha 2M$. Seria interessante saber se a $\alpha 2M$ poderá exercer algum papel de inibição deste fenómeno, por ligação a citocinas e factores de crescimento localmente, já que muitos dos factores de crescimento envolvidos na angiogénese são também quimiotácticos para leucócitos.

Nos dias 10 a 12 ocorre a verdadeira fase de invasão em que o cone ectoplacentário invade a região central do mesométrio. A ausência de expressão de $\alpha 2M$ nesta região poderá facilitar a acção proteolítica do trofoblasto no seu processo de invasão, livre assim da potente acção antiproteásica da $\alpha 2M$. Por outro lado, a expressão nas áreas da decidua lateral poderá direccionar essa invasão no sentido do mesométrio impedindo uma invasão das regiões laterais. Durante os dias 11 e 12, a expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ está associada no mesométrio às células decíduais, sendo as células granulares da glândula metrial negativas. A expressão é particularmente intensa nas células decíduais que formam bainhas à volta da artéria central. No entanto, adjacente à artéria, existe uma área de negatividade composta por células granulares que não

expressam o mRNA. No dia 13, uma relação similar pode ser observada na glândula metrial, onde células tipo fibroblásticas formam uma bainha juntamente com células granulares negativas à volta das artérias revestidas por trofoblasto endovascular. A síntese perivascular do mRNA codificante da $\alpha 2M$ sugere que esta proteína poderá impedir uma invasão descontrolada dos vasos, o que originaria a destruição dos tecidos uterinos. Como as células fibroblásticas da glândula metrial também expressam o mRNA codificante da $\alpha 2M$ poderíamos especular que estas células fibroblásticas partilham um fenótipo semelhante às células decíduais do mesométrio e que uma das funções da $\alpha 2M$ seria o controlo da actividade proteolítica das células granulares da glândula metrial.

A função das células granulares da glândula metrial na gravidez dos roedores é ainda objecto de estudo. Estas células possuem nos seus grânulos citoplasmáticos serino esterases e perforina (Parr e col., 1990), proteínas citolíticas encontradas nas células NK. As células granulares poderão actuar no útero por descarga destas substâncias bioactivas que podem estar envolvidas em alterações da parede arterial facilitando a invasão do trofoblasto. A observação histológica de que as células granulares aparecem muitas vezes ligadas às células trofoblásticas em degeneração, nomeadamente junto aos espaços onde circula o sangue materno no labirinto, sugere que estas células lisam as células trofoblásticas exercendo uma função no controlo da invasão do trofoblasto. Mais uma vez, a $\alpha 2M$ poderá exercer uma potencial função de controlo da actividade proteolítica neste caso das células granulares da glândula metrial. Por outro lado, as células granulares da glândula metrial têm propriedades migratórias e como produzem citocinas importantes nos processos de activação e diferenciação celulares, como o CSF-1, o LIF e a IL-1 (Croy e col., 1991), poderão chegar a todos os locais da interface materno-fetal e libertar localmente esses factores. A $\alpha 2M$ é uma proteína com capacidade de ligação a citocinas e poderá regular essas funções. Tal como referido no capítulo da Introdução, o crescimento ectópico do trofoblasto não conduz ao recrutamento de células granulares mas a injeção de células trofoblásticas no útero leva ao aparecimento da decidua e destas células. O processo de decidualização parece assim ser necessário para a diferenciação das células granulares. É possível que a decidua proporcione sinais que regulem a diferenciação destas células. Um dos prováveis contribuintes para esta regulação poderá ser a $\alpha 2M$, principal proteína secretada pela decidua. Para se aprofundar este assunto será

necessário realizar experiências com culturas de células granulares, o que tecnicamente apresenta grandes dificuldades, e estudar os mecanismos de regulação desta população celular.

À medida que a placenta e o feto se desenvolvem, a camada muscular circular no mesométrio sofre estiramento e dissocia-se em agrupamentos de células musculares. Nesta camada muscular formam-se fendas resultando numa continuidade entre a decidua mesometrial e a glândula metrial. Estas células musculares expressam intensamente o mRNA da $\alpha 2M$, mantendo-se esta expressão até ao final da gravidez. De novo, podemos supor que este estiramento e desagregação celulares desencadeiam respostas inflamatórias e de remodelação tecidual locais, que poderão estimular a síntese de $\alpha 2M$. De facto, Wathes e Porter (1982) demonstraram que o aumento do tamanho da decidua e o aumento da pressão intrauterina provocam uma remodelação tecidual que se reflecte num aumento do número de "gap junctions" na camada muscular circular.

Neste estudo, o tipo de expressão encontrado para a $\alpha 2M$, indica que as interrelações entre os diversos tipos celulares no útero deveria ser re-examinada. A célula decidual do antimesométrio parece ser um tipo de célula única na decidua, reflectindo as suas peculiares características ultraestruturais. As células da decidua lateral e da decidua mesometrial são caracterizadas pelo seu elevado grau de expressão do mRNA da $\alpha 2M$. No entanto, as células da glândula metrial quando justapostas a artérias e células granulares da glândula metrial, também exibem níveis de expressão semelhantes aos das células deciduais do mesométrio. Esta população de células tipo fibroblásticas da glândula metrial são eventualmente indistinguíveis das células deciduais mesometriais e poderiam ser chamadas de células deciduais da glândula metrial para evitar confusões com as células granulares da glândula metrial. Assim, o facto das células tipo fibroblásticas da camada basal do antimesométrio, da glândula metrial, do mesométrio e células musculares da camada muscular circular no mesométrio, todas exibirem expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ questiona as suas interrelações ontogénicas.

4. Localização espacial e temporal dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II no útero

As respostas do útero à implantação envolvem sequencialmente processos de crescimento, diferenciação e regressão em regiões distintas do útero e que decorrem em diferentes períodos de tempo (Bell, 1983). A diferenciação das células do estroma do endométrio em células decíduais resulta de uma interacção de hormonas e factores sintetizados localmente, que provocam uma proliferação e uma diferenciação das células do estroma. Os IGFs são factores de crescimento que promovem as mitoses e a diferenciação celular numa grande variedade de tipos celulares. Assim, estudos realizados em tecidos humanos e no rato indicam que o IGF-I medeia a acção mitogénica do estradiol no endométrio (Giudice e col., 1993; Murphy e col., 1987b). O processo de decidualização implica para além da proliferação, a diferenciação celular (Bell, 1983) e pode envolver outros factores como o IGF-II (Giudice e col., 1993).

Para estudar a expressão dos mRNAs codificantes para o IGF-I e o IGF-II no útero utilizamos a técnica de hibridização *in situ*. Os resultados obtidos demonstraram que, no útero não grávido, o RNA codificante para o IGF-I era expresso em todos os tecidos uterinos, mas com particular intensidade no miométrio, observações que eram concordantes com as de Ghahary e col. (1990). Ambos os mRNAs são expressos no início da gravidez e a sua expressão diminui à medida que a decidualização progride. Após ter ocorrido a decidualização, o sinal transfere-se do antimesométrio para áreas ainda não decidualizadas do mesométrio. Estas observações são concordantes com os resultados anteriormente obtidos no decíduoma por Croze e col. (1990). Os mRNAs codificantes para os IGFs estão localizados nos locais onde ocorre a proliferação celular. De facto, no início da gravidez o sinal está localizado por todo o estroma onde se verifica a proliferação destas células, antes da sua diferenciação em células decíduais. Os IGFs poderão também ser importantes factores na diferenciação celular das células tipo fibroblásticas em células decíduais, já que, após este processo deixa de se observar a sua expressão.

Nos dias 7 e 8 ocorre a decidualização no antimesométrio. A expressão para os mRNAs dos IGFs era visível em todas as células do estroma mas particularmente intensa

na zona decidual primária, local onde se iniciou o processo de decidualização, associando, mais uma vez, a expressão destes factores com a actividade proliferativa e de diferenciação celular. Neste período, na camada muscular circular, verificou-se uma intensa expressão dos mRNAs dos dois factores. Esta observação pode reflectir uma fase de proliferação nesta região em resposta ao estiramento induzido durante o desenvolvimento da decidua antimesometrial no local de implantação. O miométrio é um tecido que sofre um estímulo durante a decidualização respondendo com actividade mitótica (Martel e col., 1984). Os IGFs poderão assim, exercer funções autócrinas neste tecido. De facto, os IGFs são factores que participam na diferenciação de mioblastos e na diferenciação e hipertrofia de células musculares (Florini e Ewton, 1990; Stewart e Rotwein, 1996) e Ghahary e Murphy (1989) demonstraram a presença de receptores para o IGF-I no miométrio. Por outro lado, Ghahary e col. (1990) que também demonstraram a expressão do mRNA codificante para o IGF-I no miométrio, sugeriram que este factor poderia actuar de modo parácrino no estroma adjacente à camada muscular. O IGF-I poderia, assim, funcionar como um factor de crescimento parácrino, mediador de interacções celulares estroma/miométrio. As funções deste factor no miométrio ainda não estão esclarecidas mas parecem ser conservadas entre espécies já que Hoppener e col. (1988) encontraram intensa expressão para o mRNA codificante para o IGF-I no miométrio humano.

Do 9º ao 10º dia de gestação o sinal desapareceu do antimesométrio e transferiu-se para o mesométrio. Entretanto, as células deciduais do antimesométrio sofreram apoptose. Esta morte programada permite a remodelação da câmara de implantação sem afectar a integridade do útero e do embrião em desenvolvimento. Os mecanismos que controlam esta morte não são conhecidos, mas parecem envolver factores de crescimento sintetizados localmente que podem acelerar a apoptose, como no caso do TGF- β 2, ou preveni-la, como no caso dos IGFs (Akcali e col., 1996; Stewart e Rotwein, 1996). Neste período da gestação verificamos a expressão do mRNA codificante para o IGF-I nas células endoteliais dos sinusóides laterais da zona das células ricas em glicogénio. Esta observação enfatiza a possível ligação do IGF-I com mitose e proliferação. De facto, Stewart e Peel (1978) observaram no útero de ratinhos ao 6º dia, figuras de mitose nas células endoteliais dos capilares laterais de onde os sinusóides laterais se desenvolvem. A

IL-6 é uma das citocinas envolvida na angiogénese e o seu mRNA é também expresso nas células endoteliais dos capilares laterais (Motro e col., 1990). O processo de angiogénese é controlado por vários factores de crescimento e o IGF-I parece ser também um dos factores envolvidos neste processo tendo sido demonstrada a sua função como mitogénio das células musculares vasculares (Du e Delafontaine, 1995). Ainda no mesométrio, a expressão do IGF-I era visível nas células do estroma e em células de morfologia arredondada, presumíveis precursores das células granulares da glândula metrial. Estas últimas desenvolvem-se na zona central da decidua mesometrial rodeando a artéria central do mesométrio. Este padrão de expressão está correlacionado com a fase de proliferação destas populações celulares durante a fase inicial do desenvolvimento da decidua mesometrial. Numa fase posterior de desenvolvimento, quando predominam as populações de células granulares e de células decíduais que expressam $\alpha 2M$, a expressão do IGF-I mantém-se nesta região, no entanto não se sabe se esta zona terá ainda células em proliferação.

Nos dias 11 e 12 o mRNA codificante para o IGF-I está presente no triângulo mesometrial quer nas células tipo fibroblásticas quer nas células redondas da glândula metrial. Estas células são precursoras das células granulares da glândula metrial, sugerindo, mais uma vez, que o IGF-I pode estar comprometido em processos proliferativos e de diferenciação. A glândula metrial desenvolve-se no triângulo mesometrial, uma região entre as camadas musculares. Durante o seu desenvolvimento, aparecem inicialmente numerosas células pequenas e arredondadas que serão substituídas por células granulares da glândula metrial, consideradas como formas diferenciadas das anteriores (Stewart e Peel, 1978). Estas células agrupam-se juntamente com células de morfologia tipo fibroblástica para formarem bainhas à volta dos vasos sanguíneos. Uma expressão intensa foi encontrada para o IGF-I em ambas as células redondas e fibroblásticas do triângulo mesometrial desde o dia 9 até ao dia 13. O dia de declínio na expressão fibroblástica do IGF-I corresponde ao início da expressão do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ por estas células e que aumenta a partir do dia 14. Se as células pequenas e redondas são os precursores das células granulares da glândula metrial, quer se encontrem na decidua do mesométrio quer na glândula metrial, parecem manter a expressão do IGF-I após diferenciação e aquisição do fenótipo granular. No entanto, é

provável que as células granulares da glândula metrial possam ainda proliferar, pois observam-se figuras mitóticas nestas células. Esta relação temporal e espacial entre as células tipo fibroblásticas, produtoras de $\alpha 2M$, e as células granulares da glândula metrial, produtoras de IGF-I nas bainhas celulares que rodeiam os vasos sanguíneos, sugere que a $\alpha 2M$ poderá inibir localmente a actividade do IGF-I e de enzimas proteolíticas libertadas pelas células granulares da glândula metrial.

Nos dias 13 a 16, a expressão do mRNA para o IGF-I nos tecidos maternos vai progressivamente diminuindo ficando restrito a alguns grupos de células granulares na glândula metrial. Finalmente estas células acabam por morrer por apoptose. Assim, as células precursoras das células granulares sofrem, ao longo da gravidez, divisão, diferenciação e maturação num outro tipo de célula que contém grânulos e que acaba por morrer por morte programada. As fases de proliferação e diferenciação são coincidentes com a expressão do IGF-I e a apoptose parece correlacionada com o fim da sua expressão sugerindo que este poderá estar envolvido na regulação destes processos.

Do 13^o ao 16^o dia ocorre o crescimento e a diferenciação das populações trofoblásticas da placenta hemocorial. A placenta diferencia-se em duas zonas distintas: a zona basal e o labirinto segundo um complexo programa de alterações morfológicas que envolve certamente a presença de factores de crescimento. Os nossos resultados demonstram uma intensa expressão dos mRNAs codificantes para os IGFs nos tecidos trofoblásticos sugerindo o envolvimento destes factores nos processos de crescimento e diferenciação da placenta. A expressão de ambos os mRNAs (IGF-I e IGF-II) foi intensa nas populações trofoblásticas durante o desenvolvimento do cone ectoplacentário e na sua migração na invasão da decidua mesometrial nos dias 11 e 12. Este facto sugere que estes factores de crescimento são importantes para a formação da placenta. Por outro lado, em dias posteriores com os diferentes processos de crescimento e diferenciação nos vários compartimentos placentários verificou-se uma diferente expressão destes mRNAs, o que poderá reflectir processos diferenciais de crescimento nas duas zonas. No 13^o dia de gestação, quando a placenta se começa a diferenciar nas duas zonas principais, não se observam grandes diferenças na expressão dos dois mRNAs. Após o 14^o dia, o desenvolvimento placentário ocorre essencialmente à custa do crescimento da zona do labirinto. Neste período de intenso crescimento da placenta, ambos os IGFs continuam a

ser expressos no labirinto e na zona basal. Posteriormente, durante o período de maturação placentária (dia 16) a expressão para o mRNA codificante do IGF-I diminui na zona do labirinto mantendo-se na zona basal e a expressão para o mRNA codificante do IGF-II diminui ligeiramente na zona basal mantendo-se no labirinto. Para o IGF-II poderia ser detectada um máximo de expressão do mRNA nas células endoteliais dos capilares fetais e no mesênquima das trabéculas do labirinto. A expressão do IGF-II poderá assim estar relacionada com o crescimento do sistema vascular fetal e o seu mesênquima de suporte. Esta possível ligação foi também sugerida por Redline e col. (1993) nos seus estudos no ratinho, onde foi demonstrada uma expressão trofoblástica interligada com a dinâmica da diferenciação placentária. Como o crescimento da zona do labirinto afecta o tamanho da zona de interface materno/fetal e está correlacionada com o crescimento fetal, parece existir uma ligação directa entre o IGF-II placentário e o crescimento fetal.

A expressão do mRNA codificante para o IGF-I aparece associada a populações do trofoblasto específicas, isto é, à população de trofoblasto endovascular, às células gigantes e às células vacuolizadas da zona basal. Assim, o IGF-I parece estar mais relacionado com a proliferação, diferenciação e/ou migração das populações trofoblásticas e o IGF-II com os compartimentos fetais. No entanto, Kanai-Azuma e col. (1993) usando culturas de células provenientes do cone ectoplacentário demonstraram que o IGF-I promovia a proliferação celular e a migração celular, enquanto que o IGF-II promovia a diferenciação em células gigantes do trofoblasto. Estas acções dos IGFs *in vitro* poderão estar relacionadas com o crescimento do cone ectoplacentário em labirinto e com a diferenciação em células do trofoblasto vacuolizadas e em células gigantes do trofoblasto. Recentemente Han e col. (1996) estudaram a expressão dos IGFs na placenta humana. Na placenta do primeiro trimestre, o IGF-I não era detectado nos tecidos fetais enquanto que o IGF-II era encontrado nas colunas de citotrofoblastos que invadem a decidua materna sugerindo para este factor uma função no processo invasivo. Por outro lado, a sua expressão era também detectada no mesenquima das vilosidades o que pode indicar o seu envolvimento em processos de proliferação e diferenciação de citotrofoblastos em sincitiotrofoblastos.

Os IGFs parecem, assim, ser factores importantes nos processos de crescimento e diferenciação que ocorrem durante a gravidez nos vários compartimentos materno e

fetais. Alterações na sua síntese poderão servir como importantes marcadores clínicos sendo este um campo de estudo de grande importância e que actualmente está em plena expansão.

5. Discussão geral

Na mulher, durante a gravidez, o endométrio sofre transformações que originam a formação da decidua. A importância do fenómeno de decidualização não está perfeitamente esclarecida, embora se pense que é essencial para um normal desenvolvimento e função da unidade fetoplacentária. Poder-se-á antecipar que se o tecido decidual desempenha uma função fundamental na gravidez, nas espécies que exibem placentação do tipo hemocorial, então, ou a capacidade de sintetizar determinados produtos moleculares mediando esta função é conservada durante a evolução ou, em diferentes espécies, diferentes produtos moleculares desempenham a mesma função. Embora, tenham sido realizados enormes avanços no estudo das interacções materno-fetais no Homem, o Rato continua a oferecer vantagens, porque, tal como aquele, tem placentação hemocorial e poderá fornecer informações importantes sobre as interacções materno-fetais no início da gravidez.

No Homem, a principal proteína secretada pelo tecido decidual é a IGFBP-1, proteína que liga os factores de crescimento - IGFs. No Rato, o maior produto de secreção do tecido decidual é uma α 2-macroglobulina (α 2M), designada por proteína associada à decidualização-DAP (Bell 1979b). Esta proteína é imunologicamente idêntica à α 2M de fase aguda sintetizada pelo fígado de rato, a alfamacrofetoproteína (AMF). Estudos recentes demonstraram que a DAP e a AMF apesar de apresentarem pIs e organização estrutural diferente, exibem propriedades físico-químicas semelhantes, não se sabendo se são produtos de genes muito semelhantes ou, se dadas as suas origens tecidulares, sofreram modificações pós-tradução. Por forma a tentar esclarecer algumas das questões anteriormente levantadas, procedemos à realização de estudos estruturais a nível do DNA e da cadeia oligossacarídica, bem assim como a estudos funcionais a nível dos possíveis ligandos destas proteínas e da sua expressão ao longo da gestação.

Os nossos resultados de sequenciação da zona de DNA correspondente à "bait region" da DAP demonstraram homologia com a sequência da mesma região da AMF. Embora seja a "bait region" a zona que apresenta diferenças entre os vários membros da família, sendo a restante sequência altamente conservada, não poderemos concluir que existe uma global homologia entre as duas proteínas. A nível estrutural verificámos a

existência de uma diferença no conteúdo em ácido siálico sugerindo modificações pós-tradução.

A $\alpha 2M$ humana possui propriedades de inibição de proteases. Mais recentemente foi demonstrada a sua capacidade de ligação a interleuquinas e factores de crescimento. Neste estudo, demonstrámos a ligação da IL-6 e do IGF-I às duas formas de $\alpha 2M$, a hepática e a decidual, com a mesma intensidade o que pode indicar uma certa similaridade de funções entre elas. Nos hepatócitos a síntese da $\alpha 2M$ é regulada pela IL-6, IL-1 e glucocorticóides (Bauer e col., 1985, Northmann e col., 1988). A IL-6 está presente nos tecidos gestacionais, nomeadamente na decidua, e poderá exercer uma regulação local da síntese de $\alpha 2M$ e esta, por sua vez, poderá modelar a disponibilidade da IL-6 para os processos de angiogénese e remodelação tecidular. Os nossos resultados demonstraram que a $\alpha 2M$, de origem decidual e hepática, ligava a IL-6, podendo funcionar como transportadora desta molécula preservando a sua actividade biológica tal como demonstrado por Matsuda (1989).

A IGFBP-1 é comprovadamente uma proteína que liga o IGF-I. Este é um factor importante durante o processo de decidualização e no crescimento fetal. Neste estudo demonstrámos a ligação do IGF-I às duas formas de $\alpha 2M$, a hepática e a decidual, o que pode indicar uma certa similaridade de funções entre a DAP e a IGFBP-1 humana. Por outro lado, verificámos que a $\alpha 2M$ humana, no soro, liga também o IGF-I e, se atendermos ao comportamento da $\alpha 2M$ animal, é provável que a $\alpha 2M$ humana também ligue este factor a nível do endométrio. Recentemente foi descoberta a presença da $\alpha 2M$ e do seu receptor (LRP) no endométrio humano durante a fase secretora (Sayegh e col., 1995, 1997) não se sabendo ainda se esta proteína estará presente no tecido decidual durante a gestação, nem a sua função.

Bell (1979b) propôs para a $\alpha 2M$ uma função de controlo e restrição da actividade proteolítica existente no útero durante a fase de desenvolvimento da placenta. De facto, nos nossos estudos, utilizando a técnica de hibridização *in situ*, verificámos que o início da síntese do mRNA codificante para a $\alpha 2M$ ocorre no dia 9 de gravidez, período que corresponde ao início da invasão da decidua mesometrial pelo cone ectoplacentário mantendo-se a expressão na decidua durante o desenvolvimento da placenta. O padrão de expressão da $\alpha 2M$, quer em termos espaciais quer em termos temporais, sugere um

possível controlo permitindo ou direccionando a invasão trofoblástica para a zona central da decidua mesometrial, que contém a artéria mesometrial. Subsequentemente, a expressão alarga-se para a glândula metrial à medida que a artéria central é mais profundamente invadida, a decidua regride e a placenta se desenvolve. Para além desta actividade antiproteásica, a demonstrada capacidade de ligação da $\alpha 2M$ ao IGF-I e à IL-6 permite prever novos papéis para esta glicoproteína na interface decidua/placenta. Alguns ligandos complexados com a $\alpha 2M$ poderão manter a sua actividade, como é o caso da IL-6, enquanto que outros terão a sua actividade inibida, como poderá acontecer com o IGF-I que se liga covalentemente. A $\alpha 2M$ só poderá complexar-se com o IGF-I e afectar a sua acção na presença de proteases, quer de origem materna, quer de origem trofoblástica. Os complexos formados entre a proteína e os respectivos ligandos poderão ser interiorizados pelas células trofoblásticas, dada a existência de receptores para a $\alpha 2M$ nestas células (Jensen e col., 1988; Coukos e col., 1994).

Tem sido sugerido que a IGFBP-1, existente na decidua humana, exerce a nível local uma acção inibitória sobre os IGFs (Bell, 1989). O seu mRNA localiza-se na interface decidua-placenta em justaposição com o citotrofoblasto invasor das vilosidades coriônicas, que expressa intensamente o IGF-II (Han e col., 1996). Pelos resultados obtidos no nosso trabalho, poder-se-á propôr que a $\alpha 2M$ representará o homólogo funcional da IGFBP-1, controlando a acção dos IGFs durante a gravidez. Para além do facto da $\alpha 2M$ ligar o IGF-I, esta hipótese é sustentada pelos resultados que demonstram a expressão dos mRNAs codificantes para os IGFs na placenta em justaposição à expressão do mRNA da $\alpha 2M$ na decidua. Esta aposição anatómica sugere a participação da $\alpha 2M$ na regulação da invasão do trofoblasto. Essa regulação pode processar-se por interacção com os IGFs e por inibição das proteases trofoblásticas. Este mecanismo verifica-se para a IGFBP-1, que é uma proteína resistente à proteólise, e parece suprimir a migração do trofoblasto no tecido decidual (Lee e col., 1997).

Os IGFs, devido à sua localização anatómica, poderão actuar como reguladores autócrinos de processos de crescimento e diferenciação durante a gravidez. Por outro lado, os mRNAs codificantes para os receptores do IGF-I foram detectados em embriões em pré-implantação, podendo o IGF-I uterino exercer também, de modo parácrino, efeitos no desenvolvimento embrionário. De facto, na gravidez humana, o peso do bebé está

relacionado positivamente com os valores de IGF-I maternos (Holmes e col., 1997). Pensa-se que o IGF-II está também relacionado com o controlo de crescimento fetal pois no síndrome de Beckwith-Wiedemann, que está associado a altos níveis de IGF-II, tanto os bebés como as placentas são anormalmente grandes. O controlo da expressão dos IGFs na decidua poderá estar sob regulação hormonal, já que também a diferenciação das células do estroma está dependente dos níveis de estrogénio e progesterona. No entanto, as hormonas podem não ser os únicos reguladores, já que citocinas como a IL-1 e o TNF regulam o sistema IGF em outros locais (Fan e col., 1996). Assim, citocinas presentes no ambiente gestacional poderão ser reguladoras da síntese dos IGFs no local. A $\alpha 2M$ devido às suas propriedades de ligação a diversas citocinas e à sua localização anatómica poderá exercer uma regulação global de todos os factores de crescimento e citocinas presentes na interface materno-fetal.

Este campo de estudo é particularmente vasto requerendo novas contribuições para a determinação de todas as funções dos IGFs nas interacções materno-fetais e das suas interacções, quer sinérgicas quer antagonísticas com os seus receptores e as proteínas que os ligam. A $\alpha 2M$ só se expressa durante a gravidez e a limitação da sua distribuição, quer temporal quer espacial, reflecte potenciais funções desta proteína associadas com a reestruturação dos tecidos e com a aceitação materna do feto. As nossas observações poderão contribuir para o estudo do complexo fenómeno da decidualização e da regulação da expressão da $\alpha 2M$ no compartimento decidual, constituindo assim um desafio para novos estudos *in vivo* e *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson PA, Zorn TMT (1993). Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.* **266**, 603-628.
- Akali KC, Khan SA, Moulton BC (1996). Effect of decidualization on the expression of *bax* and *bcl-2* in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* **137**, 3123-3130.
- Akira S, Hirano T, Taga T and Kishimoto T (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF- α). *FASEB J.* **4**, 2860-2867.
- Andus T, Gross V, Tran-Thi T-A, Sneider G, Nagashima M, Heinrich PC (1983). The biosynthesis of acute-phase proteins in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **133**, 561-571.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Role of insulin like growth factors in embryonic and post natal growth. *Cell* **75**, 73-82.
- Bani BM, Kennedy TG (1995). Interleukin-1 α regulates prostaglandin production and cyclooxygenase activity in sensitized rat endometrial stromal cells *in vitro*. *Biol. Reprod.* **53**, 126-132.
- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br. Med. J.* **298**, 564-567.
- Barrett AJ e Starkey PM (1973). The interaction of α 2-macroglobulin with proteinases. *Biochem. J.* **133**, 709-724.
- Barrett AJ, Brown MA, Sayers CA (1979). The electrophoretically "slow" and "fast" forms of the α 2-macroglobulin molecule. *Biochem. J.* **181**, 401-418.
- Barrios V, Argente J, Pozo J, Hervás, Muñoz MT, Sanchez JI, Hernandez M (1996). Insulin-like growth factor I, Insulin-like growth factor binding proteins, and growth hormone binding protein in spanish premature and full-term newborns. *Horm. Res.* **46**, 130-137.
- Bauer J, Weber W, Thran.Thi T-A, Northoff G-H, Decker K, Gerok W e Heinrich P (1985). Murine interleukin-1 stimulates α 2-macroglobulin synthesis in rat hepatocyte primary cultures. *FEBS Lett.* **190**, 271-274.
- Bell SC (1979a). Protein synthesis during deciduoma morphogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* **20**, 811-821.
- Bell SC (1979b). Synthesis of "decidualization-associated protein" in tissues of the rat uterus and placenta during pregnancy. *J. Reprod. Fert.* **49**, 177-181.
- Bell SC (1979c). Immunochemical identity of "decidualization-associated protein" and α 2 acute-phase macroglobulin in the pregnant rat. *J. Reprod. Immunol.* **1**, 193-206.
- Bell SC (1980) Effects of oestradiol and progesterone on the concentrations of α 2-macroglobulin in the sera of injured male and female rats. *J. Endocrinol.* **86**, 189-191.

- Bell SC (1983). Decidualization: regional differentiation and associated function. *In: Oxford Reviews of Reproductive Biology*, ed. CA Finn, Clarendon Press, Oxford, 220-271.
- Bell SC (1986). Secretory endometrial and decidual proteins: studies and clinical significance of a maternally derived group of pregnancy-associated serum proteins. *Hum. Reprod.* **1**, 129-143.
- Bell SC (1989). Decidualization and insulin-like growth factor (IGF) binding protein: implications for its role in stromal cell differentiation and the decidual cell in haemochorial placentation. *Hum. Reprod.* **4**, 125-130.
- Bell SC, Reynolds S, Heald PJ (1976). Presumptive induced protein synthesis in the rat uterus during early pregnancy. *J. Endocrinol.* **68**, 34-35.
- Bell SC, Hamer J, Heald PJ (1980). Induced protein and deciduoma formation in rat uterus *Biol. Reprod.* **23**, 935-940.
- Bell SC, Hales MW, Patel S, Kirkwan PH and Drife JO (1985). Protein synthesis and secretion by the human endometrium and decidua during early pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **92**, 793-803.
- Bell SC, Patel SR, Jackson JA, Waites GT (1988). Major secretory protein of human decidualized endometrium in pregnancy is an insulin-like growth factor-binding protein. *J. Endocr.* **118**, 317-328.
- Bell SC, Jackson JA, Ashmore J, Zhu HH, Tseng L (1991). Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 synthesis and secretion by progesterin and relaxin in long term cultures of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* **72**, 1014-1024.
- Benjamin DC, Weimer HE (1966). Synthesis of α 2-AP (acute phase) globulin of rat serum by the liver. *Nature* **209**, 1032-1033.
- Bhatt H, Brunet L, Stewart CL (1991). Uterine expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11408-11412.
- Björk I, Fish WW (1982). Evidence for similar conformational changes in α 2-macroglobulin on reaction with primary amines or proteolytic enzymes. *Biochem. J.* **207**, 347-356.
- Bolton AE, Clough KJ, Stoker RJ, Pockley AG, Mowles EA, Westwood OM (1987). Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *The Lancet* **14**, 593-595.
- Bonvissuto A, Lala P, Kennedy T, Nygard K, Lee D, Han V (1992). Induction of transforming growth factor- α gene expression in rat decidua is independent of the conceptus. *Biol. Reprod.* **46**, 607-616.
- Borth W (1992). α 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J.* **6**, 3345-3353.
- Borth W, Teodorescu M (1986). Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by α 2-macroglobulin-trypsin complexes. *Immunology* **57**, 367-371.

- Borth W, Luger TA (1989). Identification of α 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein: binding of interleukin-1 β to "F" α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **264**, 5818-5825.
- Borth W, Dunky A, Kleesiek K (1986). Alpha2-macroglobulin proteinase complexes as correlated with alpha1-proteinase inhibitor-elastase complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**, 319-324.
- Borth W, Scheer B, Urbanski A, Luger TA, Sottrup-Jensen L (1990). Binding of interleukin-1 β to α -macroglobulins and release by thioredoxin. *J. Immunol.* **145**, 3747-3754.
- Bosanquet AG, Chandler AM, Gordon AH (1976). Effects of injury on the concentration of α 1-macroglobulin and α 2-macroglobulin in the plasmas of male and female rats. *Experientia* **32**, 1348-1349.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bull. of the World Health Organization (1970) Fetospecific serum proteins: Recommendations for a uniform terminology, **43**, 309-310.
- Bulmer D, Dickson AD (1961). The fibrinoid capsule of the rat placenta and the disappearance of the decidua. *J. Anatomy.* **95**, 300-310.
- Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC (1989). The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**, 87-101.
- Caufriez A, Frankenne F, Hennen G, Copinschi G (1994). Regulation of maternal insulin-like growth factor I by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-I on fetal growth. *Hormone Res.* **42**, 62-65.
- Cerro JA, Pintar JE (1997). Insulin-like growth factor binding protein gene expression in the pregnant rat uterus and placenta. *Dev. Biol.* **184**, 278-295.
- Chase T Jr, Shaw E (1967). p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 508-514.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of mRNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Choudhuri R e Wood G (1993). Production of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in the uterus of pseudopregnant mice. *Biol. Reprod.* **49**, 596-603.
- Chrousos GP (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1351-1362.
- Chu CT, Pizzo SV (1993). Receptor-mediated antigen delivery into macrophages: Complexing antigen to α 2-macroglobulin enhances presentation to T cells. *J. Immunol.* **150**, 48-58.
- Chu CT, Rubenstein DS, Enghild JJ, Pizzo SV (1991). Mechanism of insulin incorporation into α 2-macroglobulin: implications for the study of peptide and growth factor binding. *Biochemistry* **30**, 1551-1560.
- Chu CT, Howard GC, Misra UK, Pizzo SV (1994). α 2-Macroglobulin: A sensor for proteolysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 291-307.

- Clemmons DR (1991). Insulin-like growth factor binding proteins: roles in regulating IGF physiology. *J. Dev. Physiol.* **15**, 105-110.
- Cohen T, Nahari D, Cerem L, Neufeld G, Levi B (1996). Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 736-741.
- Cohick WS, Clemmons DR (1993). The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 131-153.
- Coukos G, Gafvels ME, Wisel S, Ruelaz EA, Strickland DK, Strauss III JF, Coutifaris C (1994). Expression of α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and the 39-kd receptor-associated protein in human trophoblasts. *Am. J. Pathol.* **144**, 383-392.
- Croy BA, Guilbert LJ, Browne MA, Gough NM, Stinchcomb DT, Reed N, Wegmann TG (1991). Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.* **19**, 149-166.
- Croze F, Kennedy TG, Schroedter IC, Friesen HG, Murphy LJ (1990). Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 in the rat uterus during decidualization. *Endocrinology* **127**, 1995-2000.
- Czech MP (1989). Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* **59**, 235-238.
- Daiter E, Pollard JW (1992). Colony stimulating factor-1 (CSF-1) in pregnancy. *Reprod. Med. Rev.* **1**, 83-97.
- Danielpour D, Sporn MB (1990). Differential inhibition of transforming growth factor β 1 and β 2 activity by α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **275**, 6973-6977.
- Darcy DA (1955). Immunological discrimination between the blood of normal and of tumour-bearing rats. *Nature* **1**, 643-644.
- Darcy DA (1960). A quantitative study of a serum protein associated with tissue growth. Levels found in rats under various physiological conditions. *Brit. J. Cancer* **14**, 524-533.
- Davies e Glasser (1968). Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat.* **69**, 542-608.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78-80.
- De Feo VJ (1967) Decidualization. *In*:: *Celular biology of the uterus*, ed. RM Wynn, North Holland, Amsterdam, 191-290.
- De M, Sanford TR, Wood GW (1993). Expression of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor α in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 83-89.
- Delgado SR, McBey B, Yamashiro S, Fujita J, Kiso Y, Croy AC (1996). Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population from the pregnant mouse uterus. *J. Leukocyte Biol.* **59**, 262-269.

- Denari JH, Germino NI, Rosner JM (1976). Early synthesis of uterine proteins after a decidual stimulus in the pseudopregnant rat. *Biol. Reprod.* **15**, 1-8.
- Denker H-W (1993). Implantation: A cell biological paradox. *J. Exp. Zool.* **266**, 541-558.
- Dennis PA, Sakasela O, Harpel P, Rifkin DB (1989). α 2-macroglobulin is a binding protein for basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7210-7216.
- Du J, Delafontaine P (1995). Inhibition of vascular smooth muscle cell growth through antisense transcription of a rat insulin-like growth factor I receptor cDNA. *Circ. Res.* **76**, 963-972.
- Dudley DJ, Trautman MS, Araneo BA, Edwin SS, Mitchell MD (1992). Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: regulation by inflammatory cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 884-889.
- Dunn JT, Spiro RG (1967). The α 2-macroglobulin of human plasma. I. Isolation and composition. II. Studies on the carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* **242**, 5549-5563.
- Enders AC, Schlafke S (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am. J. Anat.* **120**, 185-226.
- Enders AC, Welsh AO (1993). Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *J. Exp. Zool.* **266**, 578-587.
- Enghild JJ, Thorgersen B, Roche PA, Pizzo SV (1989). A conserved region in α -macroglobulins participates in binding to the mammalian α -macroglobulin receptor. *Biochemistry* **28**, 1406-1412.
- Fan J, Wojnar M, Theodorakis M, Lang C (1996). Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. *Am. J. Physiol.* **270**, R621-R629.
- Fazleabas AT, Verhage HG, Waites G, Bell SC (1989). Characterization of an insulin-like growth factor binding protein, analogous to human pregnancy-associated secreted endometrial alpha1-globulin, in decidua of the baboon (*Papio anubis*) placenta. *Biol. Reprod.* **40**, 873-885.
- Feinman RD (1994). The proteinase-binding reaction of α 2M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 245-266.
- Feldman SR, Gonias SL, Pizzo SV (1985). Model of α 2-macroglobulin structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 5700-5704.
- Finn CA, Martin L (1974). The control of implantation. *J. Reprod. Fert.* **39**, 195-206.
- Finn CA (1977). The implantation reaction. *In: Biology of the uterus 2nd ed*, ed. RM Wynn, Plenum Press, New York, 245-308.
- Finn CA, McLaren A (1967). A study of the early stages of implantation in mice. *J. Reprod. Fert.* **13**, 259-267.
- Florini JR, Ewton DZ (1990). Highly specific inhibition of IGF-I-stimulated differentiation by an antisense oligodeoxyribonucleotide to myogenin mRNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 13435-13437.

- Forejt J, Gregorova S (1992). Genetic analysis of genomic imprinting: an imprintor-1 gene controls inactivation of the paternal copy of the mouse Tme locus. *Cell* **70**, 443-450.
- Frank GR, Brar AK, Cedars MI, Handwerger S (1994). Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* **134**, 258-263.
- Frank GR, Brar AK, Jikihara H, Cedars MI, Handwerger S (1995). Interleukin-1 β and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible autoregulator of decidualization in humans. *Biol. Reprod.* **52**, 184-191.
- Ganrot K (1973). Rat α 2-acute phase globulin, a human α 2-macroglobulin homologue. Interaction with plasmin and trypsin *Biochim. Biophys. Acta* **322**, 62-67.
- Gauthier F, Mouray H (1976). Rat α 2M acute-phase macroglobulin. *Biochem. J.* **159**, 661-665.
- Gehring MR, Shiels BR, Northemann W, de Bruijn MH, Kan C-C, Chain AC, Noonan DJ, Fey GH (1987). Sequence of rat liver α 2-macroglobulin and acute phase control of its messenger RNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 446-454.
- Gettins PG, Crews BC (1993). Epidermal growth factor binding to human α 2-macroglobulin. Implications for α 2-macroglobulin-growth factor interactions. *Biochemistry* **32**, 7916-7921.
- Ghahary A, Murphy LJ (1989). Uterine insulin-like growth factor-I receptors: regulation by estrogen and variation throughout the estrous cycle. *Endocrinology* **125**, 597-604.
- Ghahary A, Chakrabati S, Murphy LJ (1990). Localization of the sites of synthesis and action of insulin-like growth factor-I in the rat uterus. *Mol. Endocrinol.* **4**, 191-195.
- Gibori G, Rothchild I, Pepe G, Morishige W, Lam P (1974). Luteotropic action of the decidual tissue in the rat. *Endocrinology* **95**, 113-118.
- Gitlin D and Boesman M (1967). Sites of serum α -fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J. Clin. Invest.* **46**, 1010-1016.
- Giudice LC (1994). Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* **61**, 1-17.
- Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990). Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 806-816.
- Giudice LC, Milkowski DA, Lamson G, Rosenfeld R, Irwin JC (1991). Insulin-like growth factor binding proteins in human endometrium: steroid-dependent messenger ribonucleic acid expression and protein synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**, 779-787.
- Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR (1993). Differential expression of mRNAs encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**: 1115-1122.
- Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **176**, 751-758.

- Gonias SL (1992). α 2-Macroglobulin: A protein at the interface of fibrinolysis and cellular growth regulation. *Exp. Hematol.* **20**, 302-311.
- Gonias SL, Reynolds JA, Pizzo SV (1982). Physical properties of human α 2-macroglobulin following reaction with methylamine and trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **705**, 306-314.
- Gonias SL, Young WW, Fox JW (1989). Cleavage of recombinant murine interferon- γ by plasmin and miniplasmin. *J. Interferon Res.* **9**, 517-523.
- Gordon H (1976). The α -macroglobulins of rat serum. *Biochem. J.* **159**, 643-650.
- Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK (1992). Localization of transforming growth factor- β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* **46**, 561-572.
- Groot C de, O'Brien T, Taylor R (1996). Biochemical evidence of impaired trophoblastic invasion of decidual stroma in woman destined to have preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**, 24-29.
- Guimond M, Wang B, Fujita J, Terhorst C, Croy BA (1996). Pregnancy-associated uterine granulated metrial gland cells in mutant and transgenic mice. *Am. J. Reprod. Immunol.* **35**, 501-509.
- Hall SW, LaMarre J, Marshall LB, Hayes MA, Gonias SL (1992). Binding of transforming growth factor- β 1 to α 2-macroglobulin reacted with methylamine and to binary and ternary α 2-macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem. J.* **281**, 569-575.
- Han VKM, Basset N, Walton J, Chaalis JRG (1996). The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2680-2693.
- Harpel PC (1973). Studies on human plasma α 2-macroglobulin enzyme interactions: evidence for proteolytic modification of the subunit chain structure. *J. Exp. Med.* **138**, 508-513.
- Harper MJK (1989). Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction?. *Biol. Reprod.* **40**, 907-913.
- Hattori M, Abraham LJ, Northemann W, Fey G, (1990). Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat α 2-macroglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2364-2368.
- Haverback BJ, Dyce B, Bundy HF, Wirtschafter SK e Edmondson (1962) Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes *J. Clin. Invest.* **41**, 972-980.
- Hayashida K, Tsuchiya Y, Kurokawa S, Hattori M, Ishibashi H, Okubo H, Sakaki Y (1986). Expression of rat α 2-macroglobulin gene during pregnancy. *J. Biochem.* **100**, 989-993.
- Heald PJ (1976). Biochemical aspects of implantation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **25**, 29-52.
- Heim WG (1962). A rat serum protein related to reproduction, tissue synthesis and lactation. *Nature* **193**, 491
- Heim WG (1968). Relation between rat slow alpha2-globulin and alpha2-macroglobulin of other mammals. *Nature* **217**, 1057-1059.

- Heim WG, Ellenson SR (1965). Involvement of the adrenal cortex in the appearance of rat slow α_2 -globulin. *Nature* **208**, 1330-1331.
- Heim WG, Ellenson SR (1967). Adrenal cortical control of the appearance of rat slow α_2 -globulin. *Nature* **213**, 1260-1261.
- Heumann D, Vischer T (1988). Immunomodulation by α_2 -macroglobulin and α_2 -macroglobulin-proteinase complexes: the effect on the human T lymphocyte response. *Eur. J. Immunol.* **18**, 755-760.
- Heyborn KD, Eitkin SS, McGregor JA (1992). Tumor necrosis factor- α in midtrimester amniotic fluid is associated with impaired intrauterine fetal growth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**, 920-925.
- Hirano T (1992). The Biology of IL-6. *In: Interleukins: Molecular biology and immunology. Chemical Immunology*, ed. T Kishimoto, K Basel, Switzerland, 153-180.
- Hoffman LH, Wooding FBP (1993). Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J. Exp. Zool.* **266**, 559-577.
- Hoffman MR, Pizzo, S, Weinberg JB (1987). Modulation of mouse peritoneal macrophage Ia and human peritoneal macrophage HLA-DR expression by α_2 -macroglobulin "fast" forms. *J. Immunol.* **139**, 1885-1890.
- Holmes R, Montemagno R, Jones J, Preece M, Rodeck C, Soothill P (1997). Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth. *Early Hum. Dev.* **49**, 7-17.
- Hoppener JWM, Mosselman S, Roholl PJM, Lambrechts C, Sussenbach JS (1988). Expression of insulin-like growth factor-I and -II in human smooth muscle tumors. *EMBO J.* **7**, 1379-1385.
- Horn F, Wegenka U, Lütticken C, Yuan J, Roeb E, Boers W, Buschmann J, Heinrich P (1994). Regulation of α_2 -macroglobulin gene expression by interleukin-6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 308-323.
- Howell RJ, Economides D, Teisner B, Farkas AG, Chard T (1989). Placental proteins 12 and 14 in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **68**, 237-240.
- Huang JS, Huang SS, Deuel TF (1984). Specific covalent binding of platelet -derived growth factor to human plasma α_2 -macroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 342-346.
- Huang SS, O'Grady P, Huang JS (1988). Human transforming growth factor β - α_2 -macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* **263**, 1535-1541.
- Hubbard WJ, Hess AD, Hsia S, Amos DB (1981). The effects of electrophoretically "slow" and "fast" α_2 -macroglobulin on mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.* **126**, 292-299.
- Hudig D, Sell S (1978). Serum concentrations of α -macrofetoprotein (acute-phase α_2 -macroglobulin), a proteinase inhibitor, in pregnant and neonatal rats and in rats with acute inflammation. *Inflammation* **3**, 137-148.

- Hudig D, Sell S, Newell L, Becker F (1979). Rat α -macrofetoprotein (acute-phase α 2-macroglobulin) during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **39**, 3715-3719.
- Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK (1990). Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* **4**, 510-523.
- Hussaini IM, Srikumar K, Quesenberry PJ, Gonias SL (1990). Colony-stimulating factor-1 modulates α 2-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. *J. Biol. Chem.* **265**, 19441-19446.
- Irwin JC, Utian WH, Eckert RL (1991). Sex steroid and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **129**, 2385-2392.
- Irwin JC, Giudice LC (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast α 5 β 1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Regulation* **7**, 1-11.
- Jamieson JC, Friesen AD, Ashton FE, Chou B (1972). Studies on acute phase proteins of rat serum. I. Isolation and partial characterization of an α 1-acid glycoprotein and an α 2-macroglobulin. *Canad. J. Biochem.* **50**, 856-869.
- Jayatilak PG, Puryear TK, Herz Z, Fazleabas A, Gibori G (1989). Protein secretion by mesometrial and antimesometrial rat decidua: evidence for differential gene expression. *Endocrinology* **125**, 659-666.
- Jensen PH, Moestrup SK, Sottrup-Jensen L, Petersen CM, Gliemann J (1988). Receptors for α 2-macroglobulin and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta.* **9**, 463-477.
- Jones JJ, Gockerman A, Busby WH, Wright G, Clemmons DR (1993). Insulin like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to a β 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10553-10557.
- Joshi SG, Ebert KM and Smith RA (1980a). Properties of the progestin-dependent protein of the human endometrium. *J. Reprod. Fert.* **59**, 287-96.
- Joshi SG, Ebert KM and Swartz DP (1980b). Detection and synthesis of a progestagen-dependent protein in human endometrium. *J. Reprod. Fert.* **59**, 273-285.
- Kalyan NK, Bahl OP (1983). Role of carbohydrate in human chorionic gonadotropin. Effect of deglycosylation on the subunit interaction and on its *in vitro* and *in vivo* biological properties. *J. Biol. Chem.* **258**, 67-74.
- Kameda T, Matsuzaki N, Keisuke S, Takayoshi O, Fumitaka S, Matsuda T, Toshio H, Kishimoto T, Tanizawa O (1990). Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta* **11**, 205-213.
- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kurohmaru M, Sakai S, Hayashi Y (1993). 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**, 252-261.

- Kaplan J, Nielsen ML (1979). Analysis of macrophage surface receptors: I. Binding of α -macroglobulin-protease complexes to rabbit alveolar macrophages. II. Internalization of α -macroglobulin-trypsin complexes by rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **254**, 7323-7328.
- Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK (1992). Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* **46**, 208-219.
- Kauma S, Matt D, Strom S, Eierman D, Turner T (1990). Interleukin-1 β , human leukocyte antigen HLA-DR α , and transforming growth factor- β expression in endometrium, placenta and placental membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 1430-1437.
- Kauma S, Herman K, Wang Y, Walsh S (1993). Differential mRNA expression and production of interleukin-6 in placental trophoblast and villous core compartments. *Am. J. Reprod. Immunol.* **30**, 131-135.
- Kennedy TG, Lukash LA (1982). Induction of decidualization in rats by the intrauterine infusion of prostaglandins. *Biol. Reprod.* **27**, 253-260.
- Kirby DRS (1963). Development of the mouse blastocyst transplanted to the spleen. *J. Reprod. Fert.* **5**, 1-12.
- Kleinfeld RG, O'Shea JD (1983). Spatial and temporal patterns of DNA synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol. Reprod.* **28**, 691-702.
- Kodelja V, Heisig M, Northemann W, Heinrich P, Zimmermann W (1986). α 2-Macroglobulin gene expression during rat development studied by *in situ* hybridization. *EMBO J.* **5**, 3151-3156.
- Koistinen R, Kalkkinen N, Huhtala M, Seppälä M, Bohn H, Rutanen E (1986). Placental protein 12 is a decidual protein that binds somatomedin and has an identical N-terminal amino acid sequence with somatomedin-binding protein from human amniotic fluid. *Endocrinology* **118**, 1375-1378.
- Koo PH (1982). Characterization of growth inhibitory activities associated with an α -macroglobulin of mice. *Cancer Res.* **42**, 1788-1797.
- Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G (1996). Transformed α 2-macroglobulin as a low-affinity growth hormone-binding protein. *Acta Paediatr. Suppl.* **417**, 108-110.
- Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML (1994). Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **170**, 1752-1759.
- Kushner I, Ganapathi M, Schultz D (1989). The acute phase response is mediated by heterogeneous mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**, 19-29.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lala PK, Graham CH (1990). Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metast. Rev.* **9**, 369-379.

- LaMarre J, Wollenberg GK, Gauldie J, Hayes MA (1990a). α 2-Macroglobulin and serum preferentially counteract the mito-inhibitory effect of transforming growth factor- β 2 in rat hepatocytes. *Lab. Invest.* **62**, 545-551.
- LaMarre J, Wollenberg GK, Gonias SL, Hayes MA (1990b). Reaction of α 2-macroglobulin with plasmin increases binding of transforming growth factor- β 1 and β 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1091**, 197-204.
- Larsson L, Neuenschwander DE, Strickland DK (1989). Reaction of proteinases with α 2-macroglobulin: Evidence for alternate reaction pathways in the inhibition of trypsin. *Biochemistry* **28**, 7636-7643.
- Lee P, Giudice L, Conover C, Powell D (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**, 319-357.
- Leger J, Oury JF, Noel M, Baron S, Benali K, Blot P, Czernichow P (1996). Growth factors and intrauterine growth retardation. I. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF Binding Protein 3 levels in normally grown and growth-retarded human fetuses during the second half of gestation. *Pediatr. Res.* **40**, 94-100.
- Legrès LG, Pochon F, Barray M, Gay F, Chouaib S, Delain E (1995). Evidence for the binding of a biologically active interleukin-2 to human α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **270**, 8381-8384.
- Lejeune B, Van Hoeck J, Leroy F (1981). Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *J. Reprod. Fert.* **61**, 235-240.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EK, Efstratiads A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF receptor (IGF-Ir). *Cell* **75**, 59-72.
- Liu Y, Tsushima T, Minei S, Sanaka M, Nagashima T, Yanagisawa K, Omory Y (1996). Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-Binding Proteins (IGFBP-1, -2, -3) in diabetic pregnancy: relationship to macrosomia. *Endocrine J.* **43**, 221-231.
- Lysiak JJ, Han VKM, Lala PK (1993). Localization of transforming growth factor α in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth. *Biol. Reprod.* **49**, 885-894.
- MacCalman CD, Furth EE, Omigbodun A, Bronner M, Coutifaris C, Strauss III, JF (1996). Regulated expression of cadherin-11 in human epithelial cells: a role for cadherin-11 in trophoblast-endometrium interactions? *Dev. Dyn.* **206**, 201-211.
- Mannhalter JW, Borth W, Eibl MM (1986). Modulation of antigen-induced T cell proliferation by α 2M-trypsin complexes. *J. Immunol.* **136**, 2792-2799.
- Martel D, Monier M, Glissant M, Psychoyos A, DeFeo V (1984). Estrogen and progesterone receptors in the endometrium, myometrium and metrial gland of the rat during the decidualization process. *Endocrinology* **114**, 1627-1634.
- Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T (1989). Identification of α 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J. Immunol.* **142**, 148-152.

- Mincheva-Nilsson L, Hammarström S, Hammarström M (1992). Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of $\gamma \sigma^+$ cells and show selective down-regulation of alloreactivity. *J. Immunol.* **149**, 2203-2211.
- Misra U, Chu C, Gawdi G, Pizzo S (1994). Evidence for a second $\alpha 2$ -macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 12541-12547.
- Miyanaga O, Okubo H, Kudo J, Ikuta T, Hirata Y (1982). Effect of $\alpha 2$ -macroglobulin on the lymphocyte response. *Immunology* **47**, 351-356.
- Moses AC, Nissley SP, Cohen KL (1976). Specific binding of a somatomedin-like polypeptide in rat serum depends on growth hormone. *Nature* **263**, 137-140.
- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E (1990). Pattern of interleukin 6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytoquine in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3092-3096.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987a). A role for the insulin-like growth factors as estromedins in the rat uterus. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **99**, 204-214.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987b). Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol. Endocrinol.* **1**, 445-450.
- Nelles LP, Schnebli HP (1982). Subunit structure of the rat α -macroglobulin proteinase inhibitors. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 677-682.
- Nieuwenhuizen W, Emeis JJ, Hemmink J (1979). Purification and properties of $\alpha 2$ acute-phase macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* **580**, 129-139.
- Norstedt G, Levinovits A, Eriksson H (1989). Regulation of uterine insulin-like growth factor I mRNA and insulin-like growth factor-II mRNA by estrogen in the rat. *Acta Endocrinol.* **120**, 446-472.
- Northemann W, Andus T, Gross V, Heinrich PC (1983). Cell-free synthesis of rat $\alpha 2$ -macroglobulin and induction of its mRNA during experimental inflammation. *Eur. J. Biochem.* **137**, 257-262.
- Northemann W, Heisig M, Kunz D, Heinrich PC (1985). Molecular cloning of cDNA sequences for rat $\alpha 2$ -macroglobulin and measurements of its transcription during experimental inflammation. *J. Biol. Chem.* **260**, 6200-6205.
- Northemann W, Shiels BR, Braciak TA, Hanson RW, Heinrich PC, Fey GH (1988). Structure and acute-phase regulation of the rat $\alpha 2$ -macroglobulin gene. *Biochemistry.* **27**, 91-94-9203.
- O'Connor-McCourt MD, Wakefield LM (1987). Latent transforming growth factor- β in serum: a specific complex with $\alpha 2$ -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **262**, 14090-14099.
- O'Grady JE, Bell SC, (1977). The role of the endometrium in blastocyst implantation. *In: Development in Mammals*, ed. MH Johnson, Elsevier, Amsterdam, 165-243.
- O'Grady JE, Bell SC, Gonovan ADT and Black W (1977). Protein synthesis in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* **77**, 21-22.

- Okubo H, Miyanaga O, Nagano M, Ishibashi H, Kudo J, Ikuta T, Shibata K (1981). Purification and immunological determinations of α 2-macroglobulin in serum from injured rats. *Biochim. Biophys. Acta* **668**, 257-267.
- Okubo H, Ishibashi H, Shibata K, Tsuda-Kawamura K, Yanase T (1984). Distribution of α 2-macroglobulin in normal, inflammatory, and tumor tissues in rats. *Inflammation* **8**, 171-179.
- Ostlund E, Bang P, Hagenas L, Fried G (1997). Insulin-like growth factor I in fetal serum obtained by cordocentesis is correlated with intrauterine growth retardation. *Hum. Reprod.* **12**, 840-844.
- Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW (1991). Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lympho-hematopoietic growth factors in mouse pre-implantation and development. *Bioassays* **13**, 535-540.
- Panrucker DE, Lorscheider FL (1983). Synthesis of acute-phase α 2-macroglobulin during fetal rat development. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **421**, 391-393.
- Panrucker DE, Lai PC, Lorscheider FL (1983). Distribution of acute-phase α 2-macroglobulin in rat fetomaternal compartments. *Am. J. Physiol.* **245**, E138-E142.
- Parr EL, Tung HN, Parr MB (1987). Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.* **36**, 211-225.
- Parr EL, Young LHY, Parr MB, Young JD-E (1990). Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.* **145**, 2365-2372.
- Parr MB, Parr EL, Munaretto K, Clark MR, Dey SK (1988). Immunohistochemical localization of prostaglandin synthase in the rat uterus and embryo during the peri-implantation period. *Biol. Reprod.* **38**, 333-343.
- Peterson CM, Ejlersen E, Moestrup SK, Jensen PH, Sand O, Sottrup-Jensen L (1989). Immunosuppressive properties of electrophoretically "slow" and "fast" form of α 2-macroglobulin. *J. Immunol.* **142**, 629-639.
- Pijnenborg R, Robsertson WB, Brosens I (1974). The arterial migration of trophoblast in the uterus of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Reprod. Fert.* **40**, 269-280.
- Pockley AG, Bolton AE (1990). The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. *Immunology* **69**, 277-281.
- Pollard JW (1991). Lymphohematopoietic cytokines in the female reproductive tract. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 772-777.
- Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley ER (1991). A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev. Biol.* **148**, 273-283.
- Psychoyos (1960). La reaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l'uterus. *Compt. Rend. Sci. Soc. Biol.* **154**, 1384-1387.
- Psychoyos A (1973). Hormonal control of ovoimplantation. *Vitamins Horm.* **31**, 201-256.

- Redline RW, Chernicky CL, Tan HQ, Ilan J, Ilan J (1993). Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Mol. Reprod. Dev.* **36**, 121-129.
- Reid RJ, Heald PJ (1970). Uptake of ³H-leucine into proteins of rat uterus during early pregnancy. *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 278-279.
- Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, Suikkari A-M, Voutilainen R, Bohn H e Rutanen (1988). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* **122**, 2150-2157.
- Roberston SA, Mayrhofer G, Seaamark RF (1992). Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-6 (IL-6) in pregnant and non-pregnant mice. *Biol. Reprod.* **46**, 1069-1079.
- Ronne H, Anundi H, Rask L, Peterson PA (1979). Nerve growth factor binds to serum α 2-macroglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 330-336.
- Rutanen E-M, Koistinen R Wahlstrom T, Sjoberg J, Stenman U-H and Seppala M (1984). Placental protein (PP12) in the human endometrium: tissue concentration in relation to histology and serum levels of PP12, progesterone and oestradiol. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **91**, 377-381.
- Rutanen E-M, Pekonen F, Makinen T (1988). Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its receptors in human secretory phase endometrium:evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**, 173-180.
- Sadek S, Unterman TG, Bell SC (1994). Epithelial localization of insulin-like growth factor binding protein 1 in the uterus of the rat during pregnancy, deciduoma-bearing pseudopregnancy and hormone treatment. *J. Reprod. Fert.* **101**, 67-75.
- Salvesen GS, Sayers CA, Barrett AJ (1981). Further characterization of the covalent linking reaction of α 2-macroglobulin. *Biochem. J.* **195**, 453-461.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning- A Laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Sarcione EJ and Bohne M (1969). Synthesis of α 2 (acute-phase) globulin by fetal and neonatal rat liver *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 1454-1456.
- Sayegh R, Awwad JT, Maxwell C, Lessey B, Isaacson K (1995). Alpha(2)-macroglobulin production by the human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 1021-1026.
- Sayegh R, Tao X, Leykin L, Isaacson K (1997). Endometrial α 2-macroglobulin; Localization by *in situ* hybridization and effect on mouse embryo development *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4189-4195.
- Schaeufele JT, Koo PH (1982). Structural comparison of rat α 1- and α 2-macroglobulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 1-7.
- Schlafke S, Enders AC (1975). Cellular basis for interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* **12**, 41-65.

- Schoknecht PA, Ebner S, Skottner A, Burrin DG, Davis TA, Ellis K, Pond WG (1997). Exogenous insulin-like growth factor-I increases weight gain in intrauterine growth-retarded neonatal pigs. *Pediatr. Res.* **42**, 201-207.
- Schreiber G, Dryburg H, Millership A, Matsuda Y, Inglis A, Phillips J, Edwards K, Maggs J (1979). The synthesis and secretion of rat transferrin. *J. Biol. Chem.* **254**, 12013-12019.
- Schultze HE, Gollner I e Heide K (1955). Zur kenntnis der α -globuline des menschlichen normalserums. *Z. Naturforsch.* **B 10**, 463-473.
- Semer D, Reisler K, MacDonald PC and Casey ML (1991). Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **622**, 99-110.
- Simón C, Frances A, Piquette GN, Danasouri IE, Zurawski G, Dang W, Polan ML (1994). Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* **134**, 521-528.
- Smith CJP, Kelleher PC (1980). Alpha-fetoprotein molecular heterogeneity. Physiologic correlations with normal growth, carcinogenesis and tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**, 1-32.
- Smith RM, Garside WT, Aghayan M, Shi C-Z, Shah N, Jarett L, Heyner S (1993). Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* **49**, 1-12.
- Sobis H, Waer M, Vandeputte M (1996). Normal and malignant trophoblast do not recruit granulated metrial gland cells. *Tumor Biol.* **17**, 13-19.
- Sottrup-Jensen L (1994). Role of internal thiol esters in the α -macroglobulin-proteinase binding mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 173-187.
- Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Magnusson S (1981). Trypsin-induced activation of the thiol esters in α 2-macroglobulin generates a short-lived intermediate ("nascent" α 2M) that can react rapidly to incorporate not only methylamine or putrescine but also proteins lacking proteinase activity. *FEBS Lett.* **128**, 123-126.
- Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, Wierzbicki DM, Jones CM, Lonblad PB, Magnusson S, Petersen TE (1984). The primary structure of human α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **259**, 8318-8327.
- Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Van Leuven F (1986). Domain structure of human α 2-macroglobulin. Characterization of a receptor binding domain obtained by digestion with papain. *FEBS* **205**, 20-24.
- Sottrup-Jensen L, Sand O, Kristensen L, Fey GH (1989). The α -Macroglobulin bait region: Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian α -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* **264**, 15781-15789.
- Spencer JA, Chang TC, Jones J, Robson SC, Preece MA (1995). Third trimester fetal growth and umbilical venous blood concentration of IGF-I, IGFBP-1, and growth hormone at term. *Arch. Dis. Child.* **73**, F87-F90.

- Stallmach T, Ehrenstein T, Isenmann S, Müller C, Hengartner H, Kägi D (1995a). The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3342-3348.
- Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P, Engelmann (1995b). Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions *Reprod. Fert. Dev.* **7**, 1573-1580.
- Starkey PM, Barrett AJ (1973). Human cathepsin B1. Inhibition by α 2-macroglobulin and other serum proteins. *Biochem. J.* **131**, 823-831.
- Stewart CE, Rotwein P (1996). Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J. Biol. Chem.* **271**, 11330-11338.
- Stewart CL (1994). The role of leukemia inhibitor factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **734**, 157-165.
- Stewart I, Peel S (1978). The differentiation of the decidua and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell Tiss. Res.* **187**, 167-179.
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M e Argraves WS (1990). Sequence identity between the α 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 17401-17404.
- Sutcliffe RG, Bolton AE, Sharp F, Ncholson LVB and Mackinnon R (1980). Purification of human alpha uterine protein. *J. Reprod. Fert.* **58**, 435-442.
- Sutcliffe RG, Joshi S, Paterson W, Bank J (1982). Serological identity between human alpha uterine protein and human progestagen-dependent endometrial protein, *J. Reprod. Fert.* **65**, 207-209.
- Tabibzadeh S, Santhanam U, Pravinkumar S, May L (1989) Cytokine-induced production of IFN β 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. *J. Immunol.* **142**, 3134-3139.
- Tamada H, McMaster MT, Flanders KC, Anderws GK, Dey SK (1990). Cell type-specific expression of transforming growth factor- β 1 in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol. Endocrinol.* **4**, 965-972.
- Tamada H, Sanjoy D, Anderws GK, Dey SK (1991). Cell-type-specific expression of transforming growth factor- α in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Biol. Reprod.* **45**, 365-372.
- Tarantal AF, Hunter MK, Gargosky SE (1997). Direct administration of insulin-like growth factor to fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **138**, 3349-3358.
- Teixeira NA (1986). A comparison of the rat proteins alphamacrofetoprotein and decidualization-associated-protein. Tese de doutoramento submetida à Univ. Strathclyde, Glasgow, U.K. (Doctor of Philosophy in the Faculty of Science).
- Teixeira NA, O'Grady JE (1992). Two forms of decidualization-associated-protein and their physicochemical relationship with acute-phase alphamacrofetoprotein in rats. *J. Reprod. Fert.* **94**, 501-509.

- Teixeira NA, Silva G, Bronze E, Sousa A, O'Grady JE (1991). Decidualization-associated-protein is an antiproteinase and inhibits lymphocyte proliferation. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 300S.
- Teixeira NA, Silva G, Gaspar C, Arala-Chaves M, O'Grady JE (1992). An immunosuppressive and B cell mitogenic protein of decidual origin. *J. Reprod. Fert.* **9**, 70.
- Thomas DJ, Richards AD, Kay J (1989). Inhibition of aspartic proteinases by α 2-macroglobulin. *Biochem. J.* **259**, 905-907.
- Thomas T (1993). Distribution of α 2-macroglobulin and α 1-acid glycoprotein mRNA shows regional specialization in rat decidua. *Placenta* **14**, 417-428.
- Thraill KM, Clemmons DR, Busby WH Jr, Handwerger S (1990). Differential regulation of IGFBP secretion from human decidual cells by IGF-I, insulin, and relaxin. *J. Clin. Invest.* **86**, 878-883.
- Todt JC, Yang Y, Lei J, Lauria MR, Sorokin Y, Cotton DB, Yelian FD (1996). Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility. *Am. J. Reprod. Immunol.* **36**, 65-71.
- Umaphysivam J and Jones WR (1978). An investigation of decidual specific proteins in the rat. *Int. J. Fert.* **23**, 138-142.
- Van Gool J, Ladiges NC (1969). Production of foetal globulin after injury in rat and man. *J. Pathol.* **97**, 115-126.
- Van Gool J, Ladiges NC, de Nie I, Boers W (1977). Inflammation inhibiting properties of rat α M foetoprotein (rat- α 2 macroglobulin), an acute phase reactant. *Agents and Actions Suppl.* **2** 149-161.
- Van Gool J, Ladiges NC, Boers W (1982). Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by α -macrofetoprotein, an acute-phase reactant of the rat. *Inflammation* **6**, 127-135.
- Verhaeghe J, Van Bree R, Van Herck E, Laureys J, Bouillon R, Van Assche A (1993) C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: Correlations with birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169**, 89-97.
- Wathes DC, Porter DG (1982). Effect of uterine distention and oestrogen treatment on gap junction formation in the myometrium of the rat. *J. Reprod. Fert.* **65**, 497-505.
- Webb DJ, Atkins TL, Crookston KP, Burmester JK, Qian SW, Gonias SL (1994). Transforming growth factor β isoform 2-specific high binding to native α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 30402-30406.
- Weimer HE, Benjamin DC (1966). Influence of adrenal cortex on synthesis of α 2-AP globulin of rat serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**, 1112-1114.
- Weimer HE, Cogshall V (1967). Divergent responses of serum glycoprotein fractions to tissue injury in adrenalectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **45**, 767-775.
- Weimer HE, Humelbaugh C, Roberts D (1967). The influence of tumor growth on the synthesis of α 2-AP (acute phase) globulin of rat serum. *Can. J. Biochem.* **45**, 1937-1941.
- Welsh AO, Enders AC (1983). Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am. J. Anat.* **167**, 463-477.

- Welsh AO, Enders AC (1985). 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**, 1-29.
- Welsh AO, Enders AC (1987). Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.* **217**, 203-219.
- Weström BR, Karlsson BW, Ohlsson K (1983). Immuno-cross-reactivity between α -macroglobulins from pig, dog, rat and man including human pregnancy-associated α 2-glycoprotein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 375-381.
- Wheeler T, Chard, T, Anthony F, Osmond (1995). Relationships between the uterine environment and maternal plasma concentrations of insulin-like growth factor binding protein-1 and placental protein 14 in early pregnancy. *Hum. Reprod.* **10**, 2700-2704.
- Wollenberg GK, LaMarre J, Rosendal S, Gonias SL, Hayes MA (1991). Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human plasma alpha2 macroglobulin. *Am. J. Pathol.* **138** 265-271.
- Yallampalli C, Rajaraman S, Nagamani M (1993). Insulin-like growth factor binding proteins in the rat uterus and their regulation by oestradiol and growth hormone. *J. Reprod. Fert.* **97**, 501-505.
- Yelavarthi KK, Chen H-L, Yang Y, Cowley BD, Fishback JL, Hunt JS (1991). Tumor necrosis factor- α mRNA and protein in rat uterine and placental cells. *J. Immunol.* **146**, 3840-3848.
- Zhou J, Bondy C (1992). Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology* **131**, 1230-1240.

APÊNDICE

APÊNDICE

1. Meios de cultura utilizados para o crescimento de bactérias

Meio de LB (Luria-Bertani) - meio líquido que permite o crescimento de diferentes estirpes bacterianas.

Composição:	Bacto-triptona	10g
	Bacto-extracto levedura	5g
	NaCl	10g

Completar o volume com água destilada até 1 litro. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 5 M.

Autoclavar 20 min a 121°C.

Meio de LB contendo ampicilina - meio líquido de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina.

Meio de L-agar - meio sólido que permite o crescimento de bactérias que são visualizados pela formação de colónias.

Composição:	Bacto-triptona	10g
	Bacto-extracto levedura	5g
	NaCl	10g
	Agar	5g

Completar o volume com água destilada até 1 litro. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 5 M. Autoclavar 20 min a 121°C.

Meio de L-agar contendo ampicilina - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina.

Meio de L-agar contendo ampicilina, IPTG e X-gal - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que possuem vectores resistentes à ampicilina; permite também a diferenciação entre vectores recombinantes e não recombinantes através, respectivamente, da formação de colónias brancas e de colónias azuis. Os vectores que contêm o gene *lac Z*, com a sequência reguladora que codifica para a formação dos 146 aminoácidos do gene da β -galactosidase, constituem colónias azuis na presença de IPTG e do substrato cromogénico X-gal, após a α -complementação

entre as estirpes hospedeiras *lac*⁻ e os vectores presentes nas mesmas. A inserção do DNA no local de clonagem impede a α -complementação e a identificação de bactérias recombinantes é facilmente detectada pela presença de uma coloração branca.

Ampicilina 50 μ g/ml - permite a selecção de vectores que contenham gene que codifica para a resistência a este antibiótico.

Composição (solução "stock"-50 mg/ml)

Ampicilina	500 mg
Água	10 ml

Esterilizar por filtração. Dividir em alíquotas de 1 ml e conservar a -20°C .

IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) - indutor do gene da β -galactosidase.

Composição (solução "stock"-10mM)

IPTG	2,383 g
------	---------

Dissolver em 100 ml de água destilada. Esterilizar por filtração. Dividir em alíquotas de 1 ml e conservar a -20°C .

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) - substrato cromogénico que permite a diferenciação entre colónias de bactérias de vectores recombinantes e não recombinantes através do aparecimento, respectivamente, de uma coloração branca e azul.

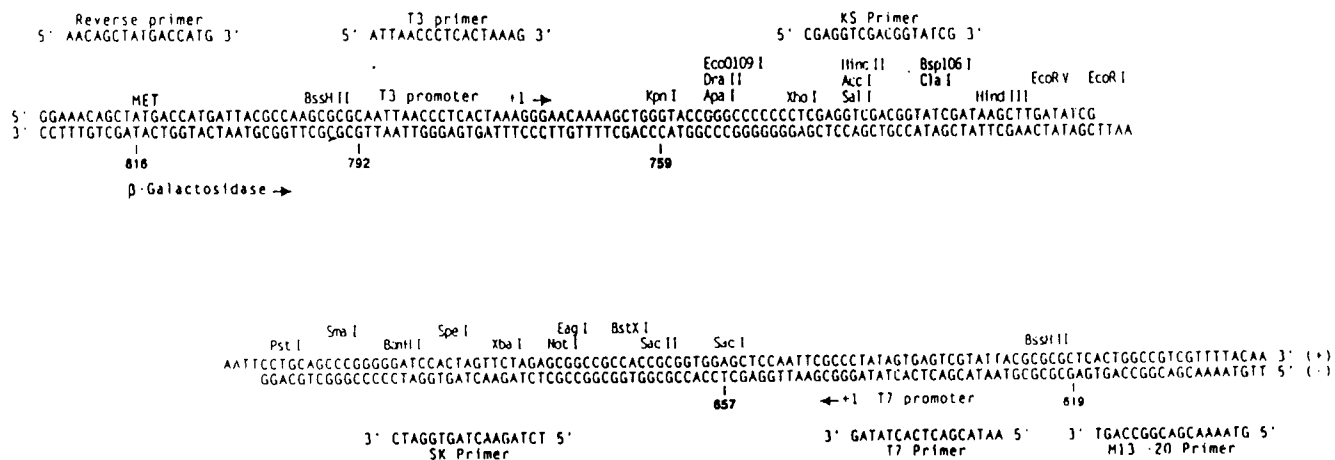
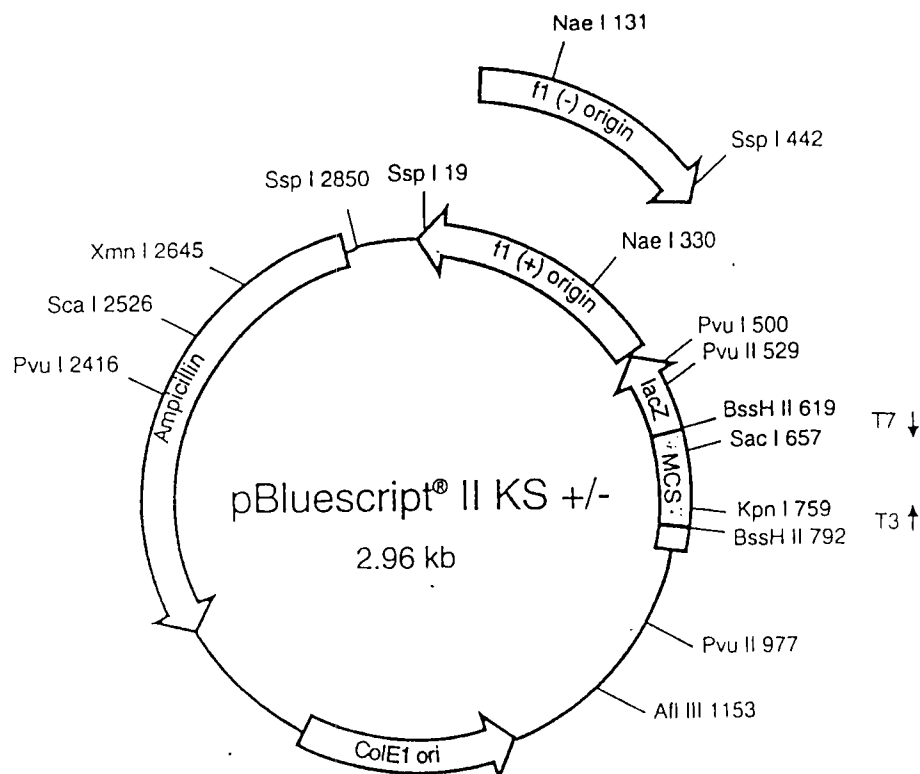
Composição (solução "stock"-200 mg/ml)

X-gal	2 g
-------	-----

Dissolver em 10 ml de dimetilformamida e conservar a -20°C .

2. VECTOR: Fagemídeo pBluescript KS (+/-)

O fagemídeo pBluescript KS (+/-) é um vector de clonagem com 2964 bp derivado do plasmídeo pUC19. Contém um "polylinker" com 21 locais de restrição e um promotor lacZ para selecção de cor de colónias azul/brancas. A designação KS indica que o "polylinker" está orientado de modo a que a transcrição de *lacZ* se processa de *KpnI* para *SacI*. A figura mostra a representação esquemática deste vector e da respectiva sequência no local de clonagem múltiplo.



3. Cuidados a ter na manipulação de RNA

As RNases são enzimas muito estáveis e com uma distribuição ubiqüitária devendo seguir-se várias regras para evitar o risco de contaminação com RNases e consequente degradação do RNA. As mãos são uma fonte de RNases, por isso, devem usar-se luvas permanentemente. Sempre que possível deverá usar-se material descartável estéril, dado que este tipo de materiais é geralmente livre de contaminação não necessitando de tratamento.

As soluções devem ser tratadas com DEPC numa concentração final de 0,1%, durante a noite, a 37°C e posteriormente autoclavadas, pelo menos durante 30 min para destruição do DEPC. O Tris precipita se o DEPC não for previamente inativado por autoclavagem. As soluções contendo Tris devem ser preparadas em material livre de RNases utilizando água tratada com DEPC já autoclavada.

O material de vidro deve ser mergulhado em solução a 3% de H₂O₂ durante 10 min, lavando-se com água tratada com DEPC. O DEPC inibe as RNases por acilação. Como potente agente acilador deve ser manuseado com cuidado e na hotte. Os materiais plásticos devem sofrer uma passagem por 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA seguida de lavagem com água tratada com DEPC.

4. Marcadores para pesos moleculares

Usaram-se marcadores com pesos moleculares conhecidos (Biorad).

Miosina	200 kDa
β-galactosidase	116 kDa
Fosforilase b	97,4 kDa
BSA	66,2 kDa
ovalbumina	45 kDa
Anidrase carbónica	31 kDa
Inibidor da tripsina de soja	21,5 kDa
Lisozima	14,4 kDa

5. Marcadores para pontos isoelétricos

Usaram-se marcadores da Pharmacia ("low pI calibration Kit")

Glucose oxidase manitol	4,15
Inibidor da tripsina de soja	4,55
β -lactoglobulina	5,20
Anidrase carbónica bovina	5,85
Anidrase carbónica humana	6,55

6. Marcadores para ácidos nucleicos

A determinação do tamanho dos fragmentos dos ácidos nucleicos foi feita na presença de marcadores de tamanhos conhecidos obtidos após digestão do DNA do fago λ com as enzimas *Hind*III e *Pvu*II. Na tabela I são apresentados os vários fragmentos resultantes da digestão do fago λ com a enzima *Hind*III (λ -*Hind*III) e com a enzima *Pvu*II (λ -*Pvu*II).

Tabela I- Tamanho dos fragmentos do λ -*Hind*III e do λ -*Pvu*II

λ - <i>Hind</i> III	λ - <i>Pvu</i> II
23,130 kb	4,421 kb
9,416 kb	4,268 kb
6,557 kb	4,194 kb
4,371 kb	3,916 kb
2,322 kb	3,638 kb
2,027 kb	2,296 kb
0,564 kb	1,708 kb
0,125 kb	0,636 kb
	0,579 kb
	0,532 kb
	0,468 kb
	0,343 kb
	0,141 kb
	0,063 kb

7. Preparação de blocos de parafina

Após fixação (formol a 10% tamponado), a peça foi mergulhada sucessivamente em banhos de:

- Álcool 70° durante 2 h
- Álcool 90° durante 2 h
- Álcool absoluto durante 2 h
- Xilol durante 45 min
- Mistura xilol: parafina durante 1 h
- Parafina líquida durante 1 h

Seguindo-se a inclusão da peça em parafina (Merck).

8. Revestimento de lâminas

1. Mergulhar as lâminas em extran a 1% durante 30 min.
2. Lavar bem em água corrente para retirar restos de detergente.
3. Lavar em água destilada 2x 5 min.
4. Lavar em etanol a 95% 2x 5 min.
5. Secar à temperatura ambiente ou com secador.
6. Revestir as lâminas com solução de 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma) preparada a 2% em acetona anidra, durante 10 seg.
7. Passar rapidamente por acetona anidra 2x 5 seg.
8. Passar 2x em água destilada tratada com DEPC.
9. Secar a 42° C, durante a noite.

9. Revestimento de lamelas

Mergulhar as lamelas numa tina contendo uma solução de 2% de dimetildiclorosilano em 1,1,1-tricloroetano, durante 5 seg. Lavar duas vezes com água, durante 5 seg e secar.

10. Tampões e soluções

100x Denhardt's 2% (p/v) BSA (fracção V)
 2% (p/v) Ficoll (tipo 400)
 2% (p/v) PVP

Esterilizar por filtração.

Formol 10% tamponado 100 ml Formaldeído 40%
 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 6,5 g Na_2HPO_4
 8 g NaCl

Dissolver os sais um a um em água antes de adicionar o formaldeído. Completar o volume para 1 litro.

PBS 8 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,44 g Na_2HPO_4
 0,24 g KH_2PO_4

Completar o volume até um litro com água e ajustar o pH 7,4. Autoclavar 20 min a 121°C.

20x SET 3 M NaCl
 0,6 M Tris-HCl pH 8
 40 mM EDTA

20x SSC 175,3 g NaCl
 88,2 g Citrato de sódio

Completar o volume até um litro com água e ajustar o pH 7,0. Autoclavar 20 min a 121°C.

20x SSPE 175,3 g NaCl
 27,6 g NaH_2PO_4
 7,4 g EDTA

Completar o volume até um litro com água e ajustar o pH a 7,4. Autoclavar 20 min a 121°C.

Solução pré hibridização

- 530 μ l Água tratada (DEPC)
- 240 μ l NaCl (DEPC)
- 200 μ l 10x PE (DEPC)
- 400 μ l Sulfato dextran 50% (DEPC)
- 30 μ l Esperma salmão desnat.
- 600 μ l Formamida

Tampão do substrato

- 20 ml 1M Tris-HCl pH 9,5
- 4 ml 5M NaCl
- 10 ml 1M MgCl₂
- 166 ml Água destilada

PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,24 g KH₂PO₄

Completar o volume com água até um litro e ajustar o pH 8,0. Autoclavar 20 min a 121°C.

