

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DURANTE A
DECIDUALIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

AUTOR: CARLOS ALBERTO MIQUELOTO

ORIENTADOR: Profº Dr. CLÁUDIO de PAULA S. GRECA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas UFPR, como parte da disciplina de Estágio em Biologia Celular, BC-013, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
1997

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
INTRODUÇÃO	4
Morfologia Geral da Decídua	4
Filamentos Intermediários na Decidualização	8
OBJETIVOS	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Animais	14
Determinação das Fases do Ciclo Estral	14
Acasalamento	14
Localização dos Sítios de Implantação	14
Procedimento Geral para Microscopia de Luz	15
Imunocitoquímica	16
RESULTADOS	18
Estrutura Histológica da Decídua Antimesometrial	18
Coloração com Imunoperoxidase	19
Sítios de Implantação – 5º dia da Gestação	19
Sítios de Implantação – 6º dia da Gestação	21
Sítios de Implantação – 7º dia da Gestação	22
Sítios de Implantação – 8º dia da Gestação	23
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	24
Figura 1	25
Figura 2	26
Figura 3	27
Figura 4	28
DISCUSSÃO	29
Reorganização na distribuição dos filamentos de desmina e aumento na intensidade de coloração imunocitoquímica nas células deciduais durante a decidualização	30
A expressão de filamentos de desmina indica o início da decidualização	33
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

DEDICATÓRIA

À Liliane, Eliza e Cláudia

AGRADECIMENTOS

Os nomes aqui citados não estão em ordem de importância

Ao amigo e Dr. Cláudio Greca pela orientação dedicada e criteriosa, pelo incentivo nos momentos mais difíceis e pelas sugestões para melhor apresentação desta monografia.

Ao Mestre Ivo Hartmann pela orientação pelo desenvolvimento dos projetos de estágio.

Ao estagiário Gabriel pelo companherismo durante o desenvolvimento desta monografia.

À secretária do curso de Ciências Biológicas (Rô) pelo auxílio indispensável durante a realização das matrículas e pelo bom humor de todos os dias.

Ao Johnny pelo empréstimo da impressora.

À Bióloga Cláudia Regina Bosa pelas sugestões e por colar as figuras nas pranchas.

À minha irmã Eliza pela ajuda e apoio em todos os momentos.

À minha mãe Liliane por ter me dado a luz.

INTRODUÇÃO

Morfologia Geral da Decídua

O processo de implantação de embriões no endométrio dos mamíferos é uma etapa crítica da gestação. Para que a implantação tenha sucesso, deve existir um nível adequado de desenvolvimento tanto embrionário como do próprio endométrio. A implantação constitui-se em um raro exemplo de interação entre tecidos de organismos geneticamente diferentes, em condições fisiológicas, visto que o desenvolvimento normal do embrião depende de um estreito contato entre os tecidos materno e fetal. O período de início da gestação é, portanto, objeto de estudo que desperta grande interesse dos pesquisadores de várias áreas do conhecimento (revisão em Abrahamsohn e Zorn, 1993).

Na maioria dos mamíferos, a partir do momento em que o embrião entra em contato com o epitélio uterino, inicia-se uma marcante e gradual modificação do tecido conjuntivo frouxo que forma o estroma endometrial. Esta modificação é caracterizada pela transformação de uma população especial de células morfológicamente descritas como fibroblastos, em células que adquirem características fenotípicas de células epiteliais. Estas novas células são poliédricas volumosas e polinucleadas e passam a ser denominadas células deciduais (Finn, 1977). Este processo de transformação celular é denominado de reação decidual ou decidualização (De Feo, 1967; Finn e Porter, 1975). A decidualização promove marcantes modificações no endométrio, de forma que este passa a exibir características de um tecido epitelial com arranjo semelhante ao parênquima hepático (Krehbiel, 1937), originando-se uma nova estrutura denominada decídua (Finn, 1977). Este processo é dinâmico e ocorre dentro de um espaço de tempo geneticamente pré-estabelecido e notavelmente curto, durante o qual os

fibroblastos endometriais adquirem progressivamente novas características morfofuncionais.

A nível ultra-estrutural, as células deciduais em transformação mostram aumento da quantidade de organelas envolvidas com a síntese e secreção de macromoléculas (Retículo Endoplasmático Rugoso, Complexo de Golgi), acúmulo de lipídios, aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto e estabelecimento de uma rica rede de junções intercelulares (Abrahamsohn, 1983). Em ratas, os fibroblastos endometriais acumulam glicogênio além de mostrarem uma clara reorganização dos nucléolos (Lundkvist, 1978). Uma característica marcante da decidualização é o acúmulo de filamentos intermediários, especialmente daqueles constituídos pela proteína desmina (Glasser e Jullian, 1986; Zorn et alii, 1990; Can et alii, 1995; Greca et alii, 1997).

A decidualização do endométrio ocorre em muitas espécies de mamíferos, incluindo os roedores e o homem. Entretanto, para que a reação decidual se efetue, é necessário que o endométrio atinja um grau de receptividade ideal o qual é obtido por ação de níveis precisos de hormônios sexuais que devem atuar em uma seqüência adequada de estrógeno-progesterona-estrógeno (Finn, 1977). A reação decidual se estabelece quando estímulos apropriados são aplicados à superfície de células epiteliais da luz uterina. Em situação fisiológica, este estímulo é fornecido pelo embrião, que por sua vez deverá estar em uma etapa adequada de desenvolvimento para que a interação seja eficiente. Esta etapa da implantação denomina-se "Janela de Implantação" (Abrahamsohn e Zorn, 1993). Este fenômeno mostra que o sincronismo de desenvolvimento entre o endométrio e o embrião é fundamental para o sucesso da implantação.

Na camundonga formam-se duas variedades de decídua, que se distinguem pelo desenvolvimento temporal, arranjo das células, algumas características morfológicas peculiares e destino das mesmas. A decídua

antimesometrial forma-se a partir da região imediatamente subjacente ao epitélio de revestimento da cripta uterina na qual o blastocisto está alojado, desenvolvendo-se na região antimesometrial do útero, ou seja, no lado oposto ao da inserção do mesométrio. Esta decídua, objetivo do presente estudo, desenvolve-se rapidamente a partir do 5º dia de gestação (DG) e sofre regressão simultânea com o crescimento do embrião, a partir do 7ºDG. Já a decídua mesometrial inicia seu desenvolvimento mais tardiamente em relação à antimesometrial, a partir do 8º DG (Snell, 1941), e tem como destino final a formação da porção materna da placenta, que nas camundongas é do tipo hemocorial (Rugh, 1968).

As regiões uterinas onde os embriões se implantam são chamadas de sítios de implantação. A reação decidual desenvolve-se centrifugamente a partir da cripta uterina que aloja o embrião e se estende de forma gradual até as imediações do miométrio, onde uma pequena região não-decidualizada é mantida durante toda a gestação. As regiões situadas entre os sítios de implantação são denominadas de sítios de interimplantação, não se deciduizam e mantêm as características do endométrio de um animal não-grávido.

A partir do 5º DG, é possível identificar na decídua antimesometrial três regiões distintas, caracterizadas por células em diferentes estágios de transformação. As células deciduais situadas logo abaixo da cripta uterina são volumosas, compactadas e polinucleadas. Constituem a região de células deciduais maduras (MDC). Na MDC os espaços intercelulares são reduzidos e dificilmente observados ao microscópio de luz. Na periferia destas células existe uma segunda região, constituída por células com características intermediárias entre os fibroblastos e as células deciduais maduras, denominada região de células pré-deciduais (PDC). As células da PDC apresentam-se relativamente volumosas com longos prolongamentos que se contactam com outras células pré-deciduais vizinhas. Os espaços

intercelulares são mais amplos do que os da MDC, porém reduzidos se comparados com o estroma não-decidualizado. Os limites entre ambas as regiões são pouco definidos (Abrahamsohn e Zorn, 1993). Finalmente, nas imediações do miométrio está a região de estroma não-decidualizado (ND), constituída por células semelhantes a fibroblastos e cujos espaços intercelulares são amplos e preenchidos por grande quantidade de matriz extracelular. As células desta região são as responsáveis pela regeneração do endométrio após o nascimento.

O desenvolvimento máximo da decídua antimesometrial da camundonga é alcançado no 8º ou 9º DG (Katz, 1981). Entretanto, estudos posteriores mostraram que já a partir do 7ºDG as células deciduais situadas nas imediações do embrião já apresentam sinais de degeneração (Bevilacqua, 1984). Deste modo, concomitantemente com a formação da decídua, inicia-se um processo de involução que ocorre na mesma direção da decidualização, ou seja, do embrião em direção ao miométrio (Katz, 1981; Katz e Abrahamsohn, 1987).

A decidualização apresenta, portanto, do ponto de vista da biologia celular e tecidual, um amplo e variado espectro de interesse. Podem ser desenvolvidos estudos envolvendo os diferentes fenômenos que participam da decidualização, tais como diferenciação celular, comportamento imunológico, expressão de receptores, rearranjo dos componentes celulares e extracelulares, formação de junções intercelulares e expressão de proteínas do citoesqueleto.

Filamentos Intermediários na Decidualização

A Decidualização do endométrio de camundongos apresenta vários fenômenos celulares importantes, sendo que um deles é o aumento da expressão de componentes do citoesqueleto celular, especialmente os filamentos intermediários (Glasser e Jullian, 1986; Zorn et alii, 1990; Can et alii, 1995; Greca et alii, 1997).

O citoesqueleto das células eucariontes é formado por uma complexa rede de proteínas filamentosas que se distribui arquitetonicamente pelo citoplasma. Estas proteínas estão diretamente relacionadas com diversas características celulares, como por exemplo influenciando o formato das células e o controle dos movimentos celulares (Can et alii, 1995). O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que se reorganiza continuamente em resposta ao meio em que a célula vive, também atuando na divisão celular (Alberts et alii, 1993).

Os componentes que constituem esta rede complexa são classificados basicamente pelo seu diâmetro e composição, em três tipos de proteínas: os **Microtúbulos**, que apresentam diâmetro na ordem de 24 nm constituídos pelas proteínas tubulinas α ; β ; e γ ; os **Filamentos de Actina**, com diâmetro médio de 6 nm constituídos pela actina G; e os **Filamentos Intermediários**, que possuem diâmetro médio de 10 nm. Estes constituem uma família de proteínas fibrosas ou filamentosas, onde se incluem a vimentina, a desmina e as lamínas nucleares (vide Tabela).

Principais Tipos de Filamentos Intermediários das Células Eucariontes de Vertebrados		
Tipo de Filamento Intermediário	Polipeptídeos Constituintes	Localização Celular
Laminas Nucleares	Laminas A, B e C (65 - 75 kDa)	Lamina nuclear do envoltório nuclear
Família da Vimentina	Vimentina (54 kDa)	Vários tipos de células de origem mesenquimal; frequentemente expressada durante fases de desenvolvimento
	Desmina (53 kDa)	Células Musculares
	Proteína Ácida Fibrilar Glial (50 kDa)	Neuróglia (Astrócitos e Células de Schwann)
	Periferina (66 kDa)	Neurônios
Queratinas ou Citoqueratinas	Tipo I (Ácida) (40 - 70 kDa)	Células Epiteliais, Células dos Folículos Pilosos e das Unhas
	Tipo II (Neutra / Básica) (40 - 70 kDa)	
Filamentos Intermediários Neurais	Proteínas dos Neurofilamentos: NF-L; NF-M e NF-H (60 - 130 kDa)	Neurônios

Segundo Alberts et al, 1993.

Vários são os estudos que relatam a expressão de filamentos intermediários em diversos tecidos, principalmente durante estágios de diferenciação celular e durante o desenvolvimento embrionário.

Ferreira et alii (1994), observaram uma reorganização de filamentos intermediários em células BHK infectadas pelo vírus da vaccinia, relatando que esta reorganização ocorre no citoplasma ao redor do núcleo das células.

Lehtonen et alii (1995), detectaram a expressão dos filamentos intermediários de citoqueratina, vimentina e desmina em células da notocorda em diferenciação. Observaram que durante a formação da notocorda em embriões humanos, as células ectodérmicas expressavam citoqueratina, vimentina e outros filamentos. Células jovens expressavam principalmente citoqueratina, enquanto que células diferenciadas expressavam principalmente vimentina mas não expressavam desmina. Segundo os autores as células da notocorda possuem características típicas de células epiteliais durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário.

A maior parte da literatura pertinente aos estudos sobre expressão e distribuição de filamentos intermediários (especialmente vimentina e desmina) são oriundos de estudos em sistemas musculares. Os trabalhos mais recentes contribuíram para reforçar a idéia de que os filamentos intermediários têm um papel fundamental na organização do citoesqueleto de células musculares desde as fases mais precoces de diferenciação muscular (células satélites) até a célula adulta (Chou et alii, 1994; Vater et alii, 1994; Baldi e Reiser, 1995). Estes autores procuravam determinar um padrão de relação entre a expressão e distribuição dos filamentos principalmente entre os filamentos de desmina e vimentina.

Chou et alii (1994), em seus estudos acerca da distribuição de desmina e alfa-actinina durante a diferenciação de células musculares lisas, relataram que células mesenquimais muito jovens expressam desmina e alfa-actinina, e que estes filamentos intermediários têm uma distribuição inespecífica no citoplasma. As células mesenquimais precursoras das células musculares lisas em estágios mais avançados de diferenciação já apresentavam pequenos sinais de organização dos filamentos de desmina e alfa-actinina. Esta distribuição se torna cada vez mais cristalina quanto mais diferenciada esta a célula, como por exemplo quando a desmina passa de uma disposição ao acaso para uma posição perimetral nas células.

Vater et alii (1994) observaram, durante regeneração de músculos esqueléticos de ratos, que há expressão de vimentina em células musculares satélites e ausência deste filamento em células adultas, seguido do aumento da expressão de desmina à medida que as células satélites iam se diferenciando em células musculares adultas. Os autores sugerem que um dos fatores que estimulam a produção de desmina é a expressão de vimentina. Baldi & Reiser (1995), relataram um aumento na quantidade de filamentos intermediários de vimentina e desmina na musculatura estriada

esquelética em fases iniciais de transformação, quando estas são submetidas a crônica estimulação de contração.

Do ponto de vista da decidualização, há um grande interesse no estudo da expressão dos filamentos intermediários vimentina e desmina, principalmente neste último, uma vez que a desmina somente é expressada por células pré-decíduais e decíduais maduras (Glasser e Julian, 1986; Glasser et alii, 1987; Zorn et alii, 1990; Can et alii, 1995; Greca et alii, 1997).

Glasser e Julian (1986) e Glasser et alii (1987), afirmam que a expressão de desmina é um marcador da decidualização de fibroblastos endometriais humanos. Até então os filamentos de desmina eram considerados exclusivos de células musculares lisas, estriadas esqueléticas e cardíacas. Nestas últimas, os filamentos de desmina estão presentes nas linhas Z dos sarcômeros, tendo o papel estrutural de manter miofibrilas vizinhas unidas entre si (Alberts et alii, 1993). Não se sabe qual o papel biológico exato desempenhado pela desmina nas células decíduais de camundongos (Zorn et alii, 1990).

A vimentina constitui o tipo de filamento intermediário mais comum, tendo sido identificada em vários tipos celulares de origem mesenquimal, tais como fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. Também é expressada por células em diferenciação. No endométrio, os fibroblastos endometriais e as células decíduais de ratos e de humanos, também são considerados tipos celulares que expressam este tipo de filamento intermediário (Glasser e Julian, 1986; Glasser et alii, 1987; Kisalus et alii, 1987).

São poucas as publicações sobre a organização do citoesqueleto em células decíduais de camundongos. Tachi et alii (1972), O'Shea et alii (1983), Welsh e Enders (1985), Zorn et alii (1990), Can et alii (1995), Greca et alii (1997) são os únicos autores que relataram um aumento da quantidade de filamentos intermediários durante a transformação de fibroblastos endometriais em células decíduais nos roedores e no homem. Zorn et alii (1990) propõem um papel biológico para os filamentos intermediários

durante a decidualização de camundongos ao demonstrar a relação existente entre a organização dos filamentos intermediários e sua associação com fagossomas contendo colágeno em células deciduais de camundongos. Greca et alii (1997) também observaram em células deciduais de camundongos, feixes de filamentos intermediários ao redor de fagossomas contendo colágeno e próximos a junções intercelulares aderentes.

Can et alii (1995) ao estudarem a expressão e distribuição *in vitro* e *in situ* dos filamentos intermediários vimentina e desmina em células deciduais humanas, consideram-nas como as principais proteínas do citoesqueleto nestas células. Segundo os autores a vimentina mantém sua expressão nas células deciduais do endométrio humano durante a maior parte da gestação, enquanto que a desmina parece existir apenas nas fases iniciais desta gestação. Os autores sugerem que a expressão de vimentina se mantém nas células deciduais durante a gestação porque provavelmente este filamento intermediário está envolvido diretamente com a morfologia celular e a integridade do citoplasma. A desmina é expressa apenas nas fases iniciais da gestação, participando da organização do citoesqueleto das células deciduais apenas nesta fase.

Como se pode constatar, a maior parte dos conhecimentos acerca dos períodos de expressão e da distribuição acerca dos filamentos intermediários durante a decidualização foram obtidas em estudos do endométrio humano. Sendo assim, desperta-se um grande interesse no sentido de se identificar os tipos de filamentos intermediários em células deciduais de roedores através de técnicas de coloração específicas, como é o caso da imunocitoquímica, uma vez que estas células, apesar de se diferenciarem de células de origem mesenquimal (como é o caso dos fibroblastos endometriais), apresentam características normalmente

encontradas somente em células epiteliais, como é o caso por exemplo de diversas variedades de junções intercelulares.

OBJETIVOS

Tendo em vista as razões expostas na introdução, o presente trabalho teve como objetivos principais, empregando-se técnicas de imunocitoquímica:

- 1) Demonstrar os filamentos intermediários de Desmina durante a decidualização de camundongos;
- 2) Descrever a distribuição destes filamentos em células deciduais maduras e pré-deciduais na decídua antimesometrial de camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* de primeira geração grávidos nos dias 5, 6, 7 e 8 da Gestação (DG), com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 20 e 40 gramas, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde recebem alimento e água *ad libitum*.

Determinação das Fases do Ciclo Estral

A determinação das fases do ciclo estral foi necessária para selecionar os animais que seriam acasalados. Para a realização dos experimentos foram selecionados camundongos nulíparos na fase de estro. A detecção desta fase foi realizada através de esfregaços vaginais e a caracterização das fases do ciclo estral obedeceu aos padrões descritos por Allen (1922) e Eckstein e Zuckerman (1956).

Acasalamento

Os camundongos nulíparos foram colocados em gaiolas, na proporção de duas fêmeas para um macho. As fêmeas foram examinadas diariamente para verificar a presença da rolha vaginal, indicativo de que houve acasalamento. O dia da presença da rolha vaginal foi considerado como o primeiro dia da gestação.

Localização dos Sítios de Implantação

Embora os embriões se implantem no endométrio no 5ºDG, a pequena dimensão dos sítios de implantação neste dia da gestação não permite uma observação à vista desarmada, como acontece nos dias de gestação subsequentes. Por esta razão, a dissecação e o isolamento destes sítios, utilizamos a técnica desenvolvida por Psychoyos (1960, 61) e por Finn e McLaren (1967), que consiste em injetar na veia da cauda do camundongo,

15 µl do corante azul de Evans a 0,1% em solução salina. Após vinte minutos sacrifica-se o animal e removem-se os cornos uterinos. Os sítios de implantação aparecem como faixas azuladas facilmente identificáveis à vista desarmada. Estas faixas se fazem presentes devido ao aumento da permeabilidade vascular que ocorre nos locais de implantação dos blastocistos. Após a localização, os sítios de implantação foram separados dos sítios de interimplantação por meio de cortes transversais ao útero feitos com lâminas de barbear. Nos 6º, 7º e 8ºDG os sítios de implantação, já identificáveis à vista desarmada, foram separados dos sítios de interimplantação, tal como descrito para o 5º DG.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

Procedimento Geral para Microscopia de Luz

Imediatamente após a obtenção das secções uterinas, os sítios de implantação foram lavados em Solução Salina Tamponada a 0,1M pH 7,4 para retirar o excesso de sangue e em seguida foram fixados na solução fixadora Metacan conforme descrito abaixo:

1. Fixação em Metacan por 03 horas à temperatura ambiente;
2. Enxague em Etanol Absoluto - 03 trocas de 10 minutos para retirar excesso de fixador;
3. Desidratação em 03 banhos de 30 minutos de Etanol Absoluto;
4. Banho durante a noite por 16 horas em mistura de Etanol Absoluto + Xileno (v/v);
5. Diafanização em 02 banhos de 30 minutos de Xileno;
6. Impregnação pela Paraplast à 56°C por 03 horas;
7. Emblocagem em Parafina;
8. Microtomia (seções consecutivas de 5µm);
9. Pescagem dos cortes (aderidos em lâminas usando 0,1 % de poli-L-lisina);
10. Coloração de um corte de cada sítio de implantação pela Hematoxilina & Eosina (H.E.);
11. Seleção de cortes contendo o embrião implantado;
12. Processamento imunocitoquímico.

Imunocitoquímica

Uma vez obtidos os cortes, os mesmos foram processados para a reação de imunocitoquímica indireta com método de revelação pela peroxidase.

Os cortes foram rehidratados e incubados primeiramente em PBS, em seguida em solução de PBS contendo peróxido de hidrogênio para inibição de peroxidases endógenas do tecido. A seguir os cortes foram incubados em meio contendo PBS/BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma Chemical CO., St Louis, MO.) e Soro Total de Carneiro, para redução de reações inespecíficas.

Seguiu-se a incubação dos cortes em câmara úmida com anticorpo policlonal anti-desmina (Sigma Co.) obtido de coelho na diluição de 1:20 em PBS/Tween 20. A incubação foi feita em câmara úmida por um período não superior à 16 horas durante a noite a 4°C.

Após este período os cortes foram novamente lavados em PBS e foi realizada a segunda incubação utilizando-se anticorpos anti-IgG de coelho (diluição 1:2000 em PBS) produzidos em carneiro, conjugado com peroxidase (Sigma). A incubação foi realizada num período não superior à 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente.

Em seguida os cortes foram processados para revelação da peroxidase utilizando-se solução de DAB (3,3-Diaminobenzidina em PBS e peróxido de hidrogênio). Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer, desidratados e montados.

O protocolo geral para a Imunoperoxidase foi:

1. Desparafinizar em Xileno – durante a noite;
2. Xileno II - 30 Minutos;
3. Rehidratação com soluções em concentrações decrescente de etanol (100%, 95% E 70% - 30 Minutos);
4. Água Destilada - 2 x 15 minutos;
5. Lavagem em PBS - 10 minutos;

6. Peróxido de Hidrogênio a 0,3 % em PBS - 15 minutos;
7. Lavagem em PBS - 3 x 10 minutos;
8. Incubação em Soro Total Não-Imunizado de Carneiro + PBS/BSA 10% v/v - 30 minutos;
9. Incubação com o anticorpo primário diluído em PBS/Tween 20 0,3% 1:20 – durante a noite a 4°C;
10. Lavagem em PBS - 3 x 10 minutos;
11. Incubação com o anticorpo secundário (Goat Anti-Rabbit IgG conjugado com Peroxidase) diluído em PBS 1:2000 - 2 hs à temperatura ambiente;
12. Lavagem em PBS - 3 x 10 minutos;
13. Revelação da reação:
 - A) Incubação em solução de Diaminobenzidina (DAB) 0,05 % em PBS - 5 minutos;
 - B) Incubação em solução de DAB + PBS + peróxido de hidrogênio - 10 minutos;
14. Lavagem em PBS - 4 x 10 minutos;
15. Lavagem em água bidestilada - 2 x 10 minutos;
16. Coloração com Hematoxilina de Mayer por 01 minuto; viragem em água de torneira - 10 minutos;
17. Desidratação com soluções em concentrações crescente de etanol e montagem em Goma de Damar;
18. Documentação em fotomicroscópio.

RESULTADOS

Estrutura histológica da Decídua Antimesometrial

Em camundongos, a implantação do embrião ocorre no 5º dia de gestação (5ºDG), ocasião em que se estabelece a reação decidual ou decidualização no endométrio da região antimesometrial dos cornos uterinos. Desta forma origina-se a Decídua Antimesometrial na respectiva região do útero, sendo esta a decídua envolvida com a implantação do blastocisto no órgão. A reação decidual progride ao longo da gestação, atingindo seu máximo desenvolvimento no 7º dia de gestação (7ºDG). A observação de cortes transversais aos sítios de implantação a partir do 5ºDG, mostra que a decídua antimesometrial é constituída por diferentes populações celulares que formam três regiões distintas: 1) região de células deciduais maduras (MDC); 2) região de células pré-deciduais (PDC) e; 3) região de células não-decidualizadas (ND) (Figuras 1A, 2A, 3A e 4A).

Tanto nos cortes submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (fotomicrografias não apresentadas) quanto naqueles tratados pela imunoperoxidase, as células deciduais maduras apareciam muito volumosas, seus núcleos eram eucromáticos (por vezes polinucleadas), nucléolos evidentes e diminutos espaços intercelulares. Estas características estavam mais evidentes na MDC do 8ºDG (Figura 4B). O conjunto apresentava um aspecto semelhante a de um tecido epitelial. Entremeados com as células deciduais maduras, era possível identificar a presença de numerosos capilares sanguíneos contínuos e vênulas pós-capilares, com células endoteliais típicas. Já as células pré-deciduais eram significativamente menores do que as maduras, apesar de os núcleos (menos volumosos) também serem eucromáticos e com nucléolos evidentes, o que indica alta atividade sintética protéica nestas células (Figura 1C e 3B). As células não-

decidualizadas por sua vez, apresentavam-se extremamente semelhantes aos fibroblastos endometriais presentes nos sítios de interimplantação.

Entre os sítios de implantação, estabelecem-se segmentos denominados sítios de interimplantação, que mantém características morfológicas semelhantes à região não-decidualizada dos animais grávidos. Apesar de não apresentarmos fotomicrografias de cortes dos sítios de interimplantação, vale colocar a ausência total de positividade nas reações imunocitoquímicas nestes sítios, com exceção às túnicas musculares lisas de arteríolas e veias e, ao tecido muscular liso do miométrio, que apresentaram intensa positividade.

Coloração com Imunoperoxidase

O padrão da reação imunocitoquímica pelo método da peroxidase (utilizando a revelação da mesma com 3,3-diaminobenzidina - DAB e peróxido de hidrogênio) foi homogêneo para todos os cortes uterinos tratados, ou seja, a cor do precipitado originado pela reação *peroxidase-DAB-H₂O₂* variava entre tons de castanho-claro até o marrom-escuro, sendo que as tonalidades mais fortes de marrom indicavam uma concentração dos filamentos intermediários constituídos pela proteína desmina.

Sítios de Implantação - 5º Dia da Gestação

Neste dia da gestação o processo de implantação do blastocisto (alojado no fundo da cripta uterina) está nas suas fases iniciais, sendo que o embrião ainda está na fase de blastulação do desenvolvimento embrionário. O blastocisto era delimitado por uma camada de células pavimentosas lembrando um endotélio - o trofoblasto. O trofoblasto estava circundando uma massa celular interna - o embrioblasto e uma cavidade - a blastocele. Nenhum sinal de reação imunocitoquímica foi identificado em qualquer parte do blastocisto (Figura 1A).

O sítio de implantação da região antimesometrial deste dia da gestação (DG) já apresentava as três regiões de células da decídua antimesometrial, tendo em vista que já havia ocorrido o contato do trofoblasto com o epitélio de revestimento da cripta uterina e, portanto, este último já sinalizava o estroma endometrial que iniciou a reação decidual. Neste ponto chamamos a atenção para o fato de que, justamente nesta câmara de implantação, somente as células epiteliais em contato com o trofoblasto terem degenerado, pois observou-se uma nítida descontinuidade no epitélio uterino neste local (Figura 1A).

Na região de células maduras que envolve a câmara de implantação, mesmo em pequeno aumento percebe-se uma evidente positividade à imunoperoxidase na forma de pequenos pontos escuros que salpicavam o tecido (Figura 1A). Esta região, quando observada em grandes aumentos no microscópio, mostrava uma intensa positividade nas imediações do núcleo das células deciduais, indicando uma concentração de filamentos intermediários contendo desmina nestes locais. O restante do citoplasma apresentava um delicada malha de finíssimos filamentos positivos (Figura 1B). Neste contexto vale realçar que a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer permitiu destacar a marcação citoplasmática mais delicada, pelo fato deste corante corar somente os núcleos celulares. Nos testes utilizando hematoxilina de Harris (corante básico mais rotineiro), esta fina malha de filamentos de desmina não aparecia, pois o corante destacava não só o núcleo como também corava em lilás o citoplasma, mascarando a reação citoquímica mais tênue.

Da mesma forma que a reação imunocitoquímica foi negativa para o endométrio dos sítios de interimplantação, as células das regiões pré-decidual (Figura 1C) e não-decidualizada reagiram negativamente ao procedimento, o que indica ausência de filamentos de desmina nas mesmas. O mesmo pode-se dizer com relação às outras populações de células da

decídua, como é o caso das células endoteliais dos capilares sanguíneos e vênulas pós-capilares. Já as células musculares lisas de vasos mais calibrosos como arteríolas e vênulas bem como o tecido muscular liso miometrial, mostraram uma forte reação positiva à imunoperoxidase.

Sítios de Implantação - 6º Dia da Gestação

Neste dia da gestação a câmara de implantação e a decídua antimesometrial já estão bem maiores. O embrião apresenta várias estruturas características de blastulação avançada, tais como os folhetos embrionários ectoderme e endoderme, saco vitelino primitivo, cavidade amniótica e celoma extra-embriônico. As células ectodérmicas aparentemente apresentavam positividade por estarem em processo de diferenciação, da mesma forma que as células decíduais. As células trofoblásticas proliferaram e invadiram as áreas adjacentes anteriormente ocupadas por células decíduais. É possível distinguir no corte histológico a área de invasão trofoblástica pela ausência de reação imunocitoquímica nas células do trofoblasto.

Entretanto a MDC está maior e suas células aparentemente aumentaram a expressão de filamentos de desmina, uma vez que a reação estava mais intensa do que aquela observada no 5ºDG. Em pequenos aumentos era fácil distinguir os limites da MDC com a PDC pela intensa coloração da primeira e negativa coloração da última (Figura 2A). Em grandes aumentos as células maduras apresentavam-se binucleadas. O citoplasma apresentava novamente uma malha de filamentos de desmina agora mais evidente e homogênea. Por vezes era nítida a concentração de filamentos de desmina não mais na forma de pontos, mas sim formando cinturões incompletos ao redor do núcleo, como uma calota, possivelmente indicando uma reorganização do citoesqueleto devido a modificação na distribuição dos filamentos intermediários (Figura 2B).

A positividade também estava evidente nas camadas do miométrio interno e externo, e ausente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (Figuras 2A e 2B).

Sítios de Implantação - 7º Dia da Gestação

Os cortes histológicos dos sítios de implantação neste DG apresentavam um processo de implantação bem avançado, com a decidua antimesometrial totalmente formada. Como sempre a MDC predominava sobre as demais regiões do endométrio (Figura 3A). O padrão de intensidade de reação manteve-se o mesmo, de forma a tornar evidente a separação entre a MDC e a PDC.

Entretanto em aumentos maiores, já se percebia uma marcante alteração na distribuição dos filamentos de desmina nas células decíduais maduras, que agora apresentavam ausência de positividade nas cercanias do núcleo, mas forte positividade abaixo dos limites celulares (membrana plasmática) (Figura 3B). Interessantemente, as células pré-decíduais apresentavam sinais de positividade muito semelhantes àquelas observadas nas células decíduais maduras do 5ºDG, na forma de pequenos pontos escuros (Figura 3B).

As células decíduais maduras em grandes ampliações, mostravam o citoplasma completamente tomado pela malha de filamentos de desmina. Como já mencionado, não raro os filamentos positivos se concentravam nos limites da célula formando cinturões de cor marrom ou castanho-escuro (Figura 3C).

Em grandes aumentos, as células da região pré-decidual - que gradativamente vão se tornando células decíduais maduras - possuíam características muito semelhantes às células decíduais maduras do 5ºDG, enquanto que as células não-decidualizadas continuavam negativas.

Sítios de Implantação - 8º Dia da Gestação

Nos sítios de implantação deste DG, a visão panorâmica do corte histológico mostrava uma decídua antimesometrial bem semelhante à decídua do 7ºDG, com exceção da câmara de implantação que apresentava o embrião já em fase de gastrulação. Nestes cortes observou-se que as células trofoblásticas haviam ocupado uma área correspondente àquela anteriormente ocupada pelas células deciduais maduras do 5ºDG (Figura 4A).

Em grandes aumentos a MDC apresentava células frequentemente polinucleadas e mesmo poliplóides. Intrigantemente, a positividade dos filamentos intermediários havia diminuído sensivelmente, restringindo-se apenas às áreas sub-plasmalemais (Figura 4B) que mesmo assim, apresentavam-se pouco reativas.

As células pré-deciduais remanescentes, pelo fato de a maioria já haver atingido a fase de células maduras, apresentavam pontos de concentração de filamentos de desmina muito semelhantes às mesmas células pré-deciduais observadas no 7ºDG. A positividade ainda era intensa no miométrio e totalmente ausente na região de células não-decidualizadas.

Por outro lado observando-se a região mesometrial do sítio de implantação, área do útero onde se formará a decídua mesometrial e futura placenta, observou-se neste DG um início de positividade a filamentos de desmina (muito semelhante ao observado na MDC do 5ºDG e PDC do 7ºDG), nas células endometriais subjacentes ao epitélio luminal, o que indica início de reação decidual nesta área do útero (Figura 4C).

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

1 2 3

FIGURA 1

Sítio de Implantação - Quinto dia de Gestação

- A) Corte transversal do sítio de implantação mostrando a câmara de implantação e a decídua antimesometrial (**am**). Observe o blastocisto (**b**) no início do processo de implantação. Abaixo do epitélio (**e**) observa-se células decíduas antimesometriais com positividade para desmina. (**setas**). x 95.
- B) Células decíduas maduras em grande aumento. Observe que as estruturas desmina-positivas estão concentradas ao redor do núcleo (**setas**), e formando uma delicada malha no citoplasma (**cabeças-de-seta**). x 950.
- C) Região de células maduras e pré-decíduas. Observe que somente as células decíduas maduras (mdc) mostram positividade para desmina (**setas**) enquanto as células pré-decíduas (pdc) ainda são negativas. x 240.

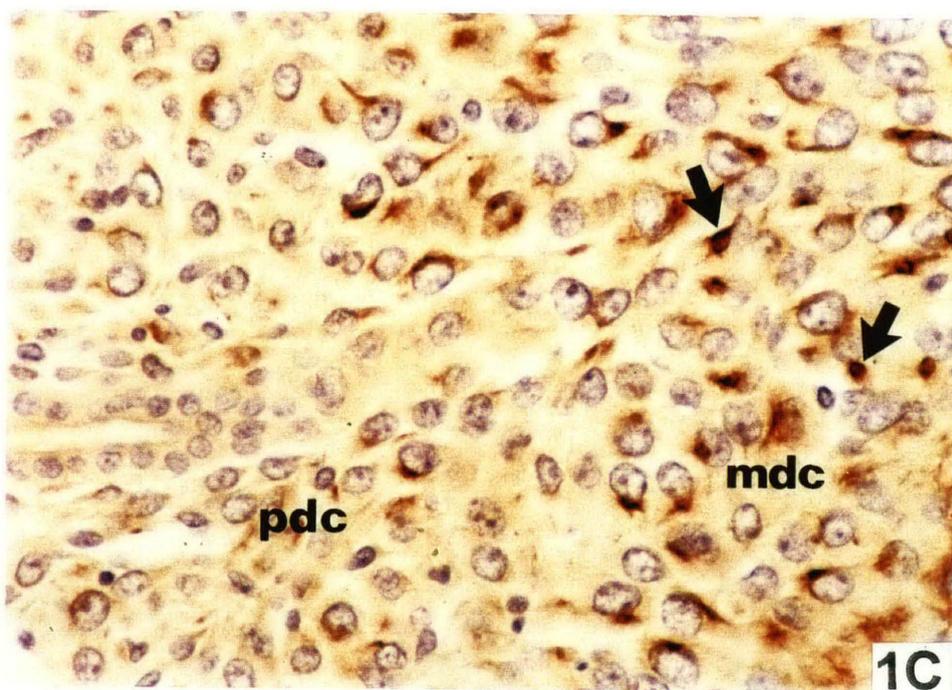
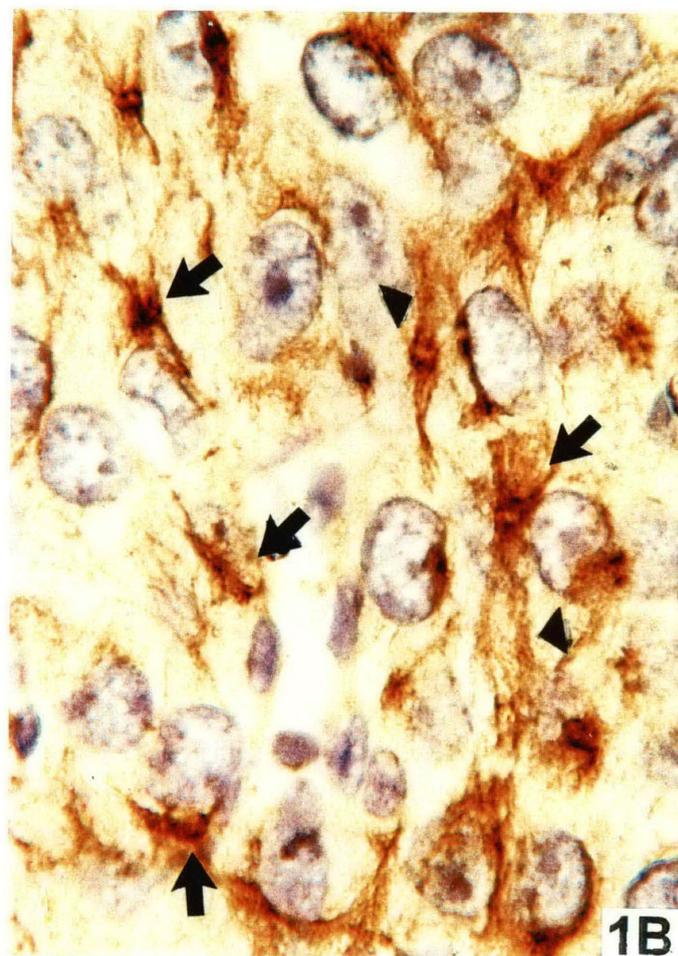


FIGURA 2

Sítio de Implantação - Sexto dia de Gestaçã

A) Corte transversal do sítio de implantação. Decídua antimesometrial. É possível observar a região das células deciduais maduras (**mdc**), pré-deciduais (**pd**) e células não-decidualizadas (**nd**). Observe que somente as células maduras apresentam positividade.

e = embrião; **im** = miométrio interno; **em** = miométrio externo.
x 25.

B) Grande aumento da região das células deciduais maduras. Compare com a Figura 1B. Observe algumas células deciduais maduras começam a apresentar modificação na distribuição dos filamentos, passando a predominar na periferia das células (**setas**). A malha positiva está mais evidente (**cabeças-de-seta**).

bv = vasos sanguíneos. x 950.

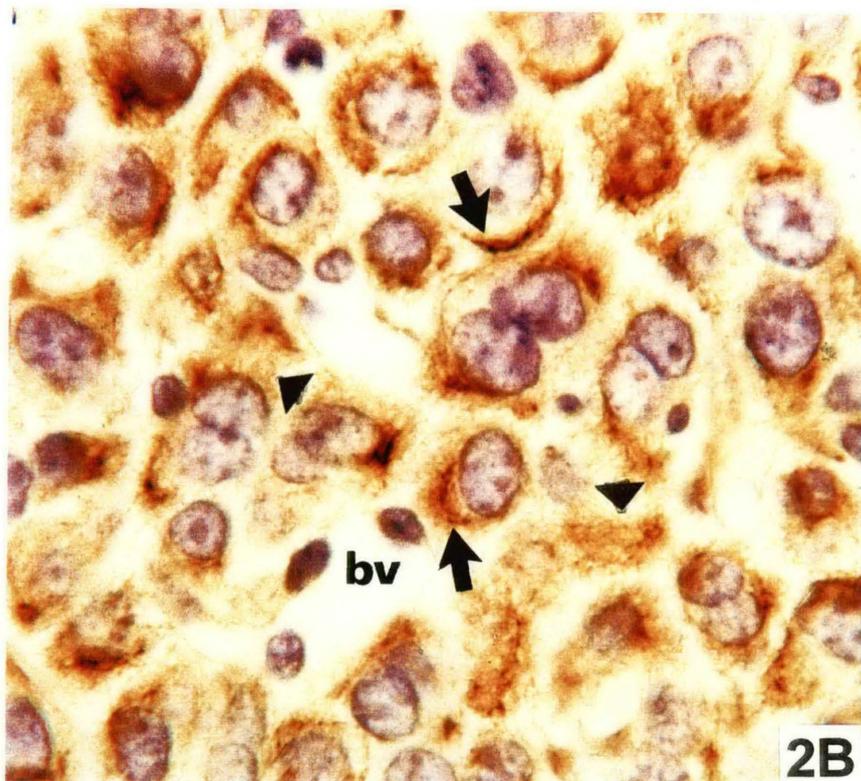
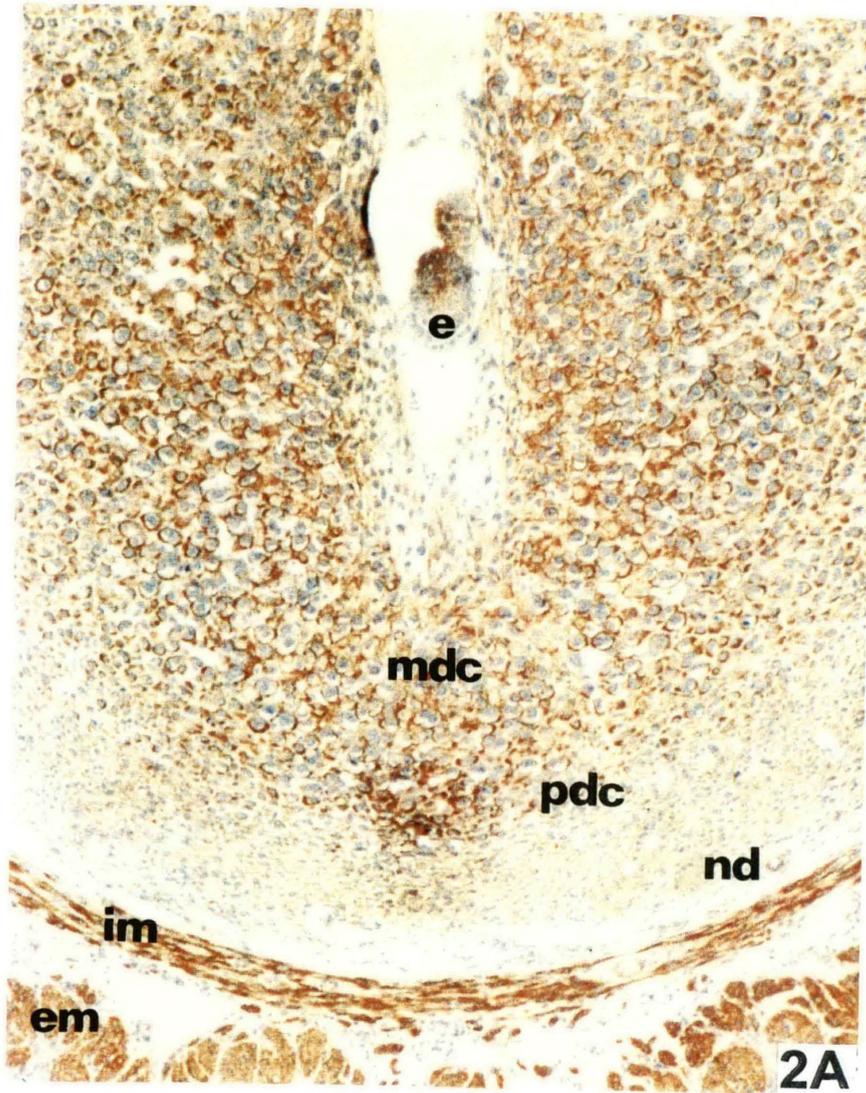


FIGURA 3

Sítio de Implantação - Sétimo dia de Gestação

- A) Corte transversal do sítio de implantação. Decídua antimesometrial. É possível reconhecer as regiões de células deciduais maduras (**mdc**), pré-decidual (**pdc**) e células não- decidualizadas (**nd**). Observe a forte positividade no miométrio. **e** = embrião. x 25.
- B) Região de transição entre células deciduais maduras e células pré-deciduals. Compare com a figura 1C. Observe a positividade em ambas as regiões, principalmente na PDC que até este dia da gestação não apresentavam reatividade (**cabeças-de-seta**).
setas = positividade nas células deciduais maduras. x 240.
- C) Grande aumento da região de células deciduais maduras. Compare com as figuras 1B e 2B. Observe uma marcante modificação na distribuição dos filamentos de desmina. Observe também que a imunocoloração na maioria das células é periférica, formando um anel (**setas**) abaixo da membrana plasmática.
bv = vasos sanguíneos. x 950.

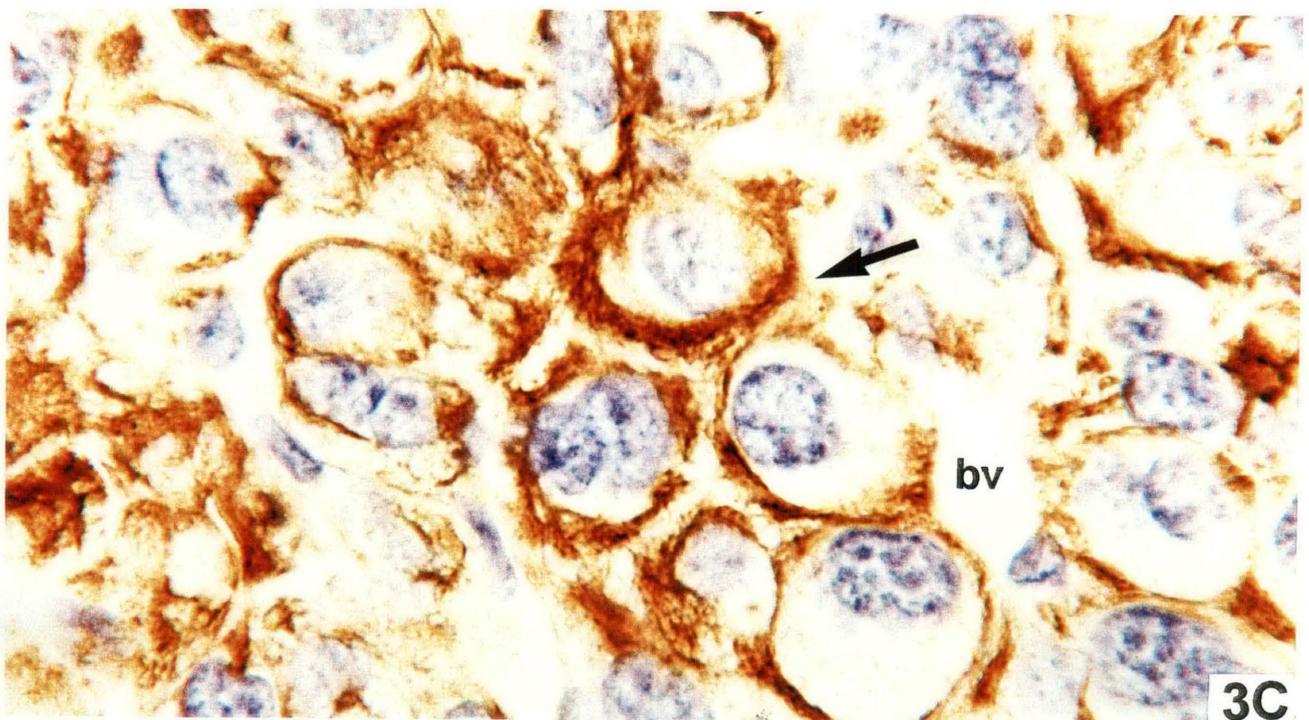
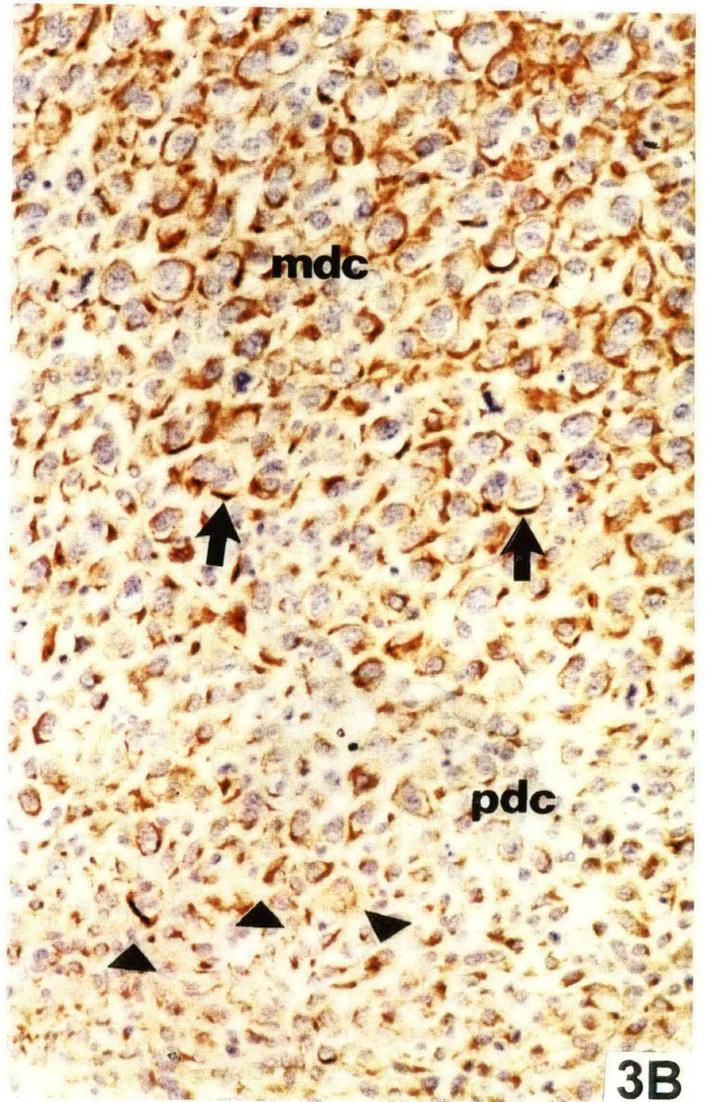
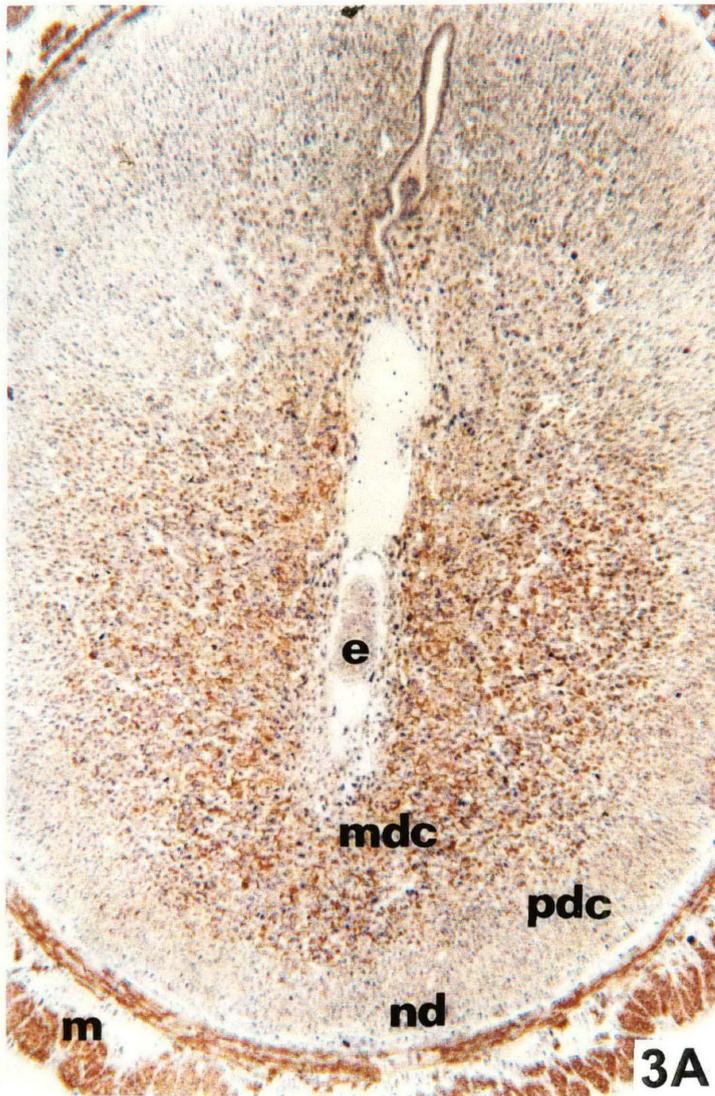
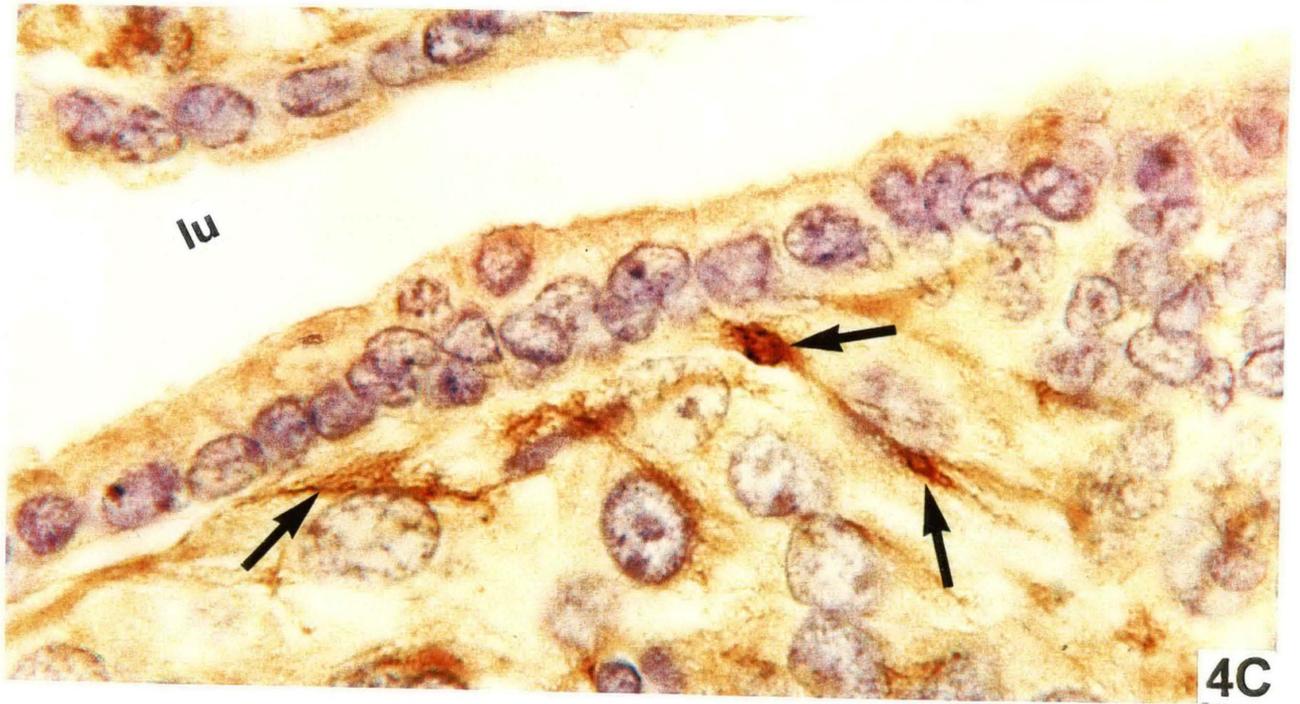
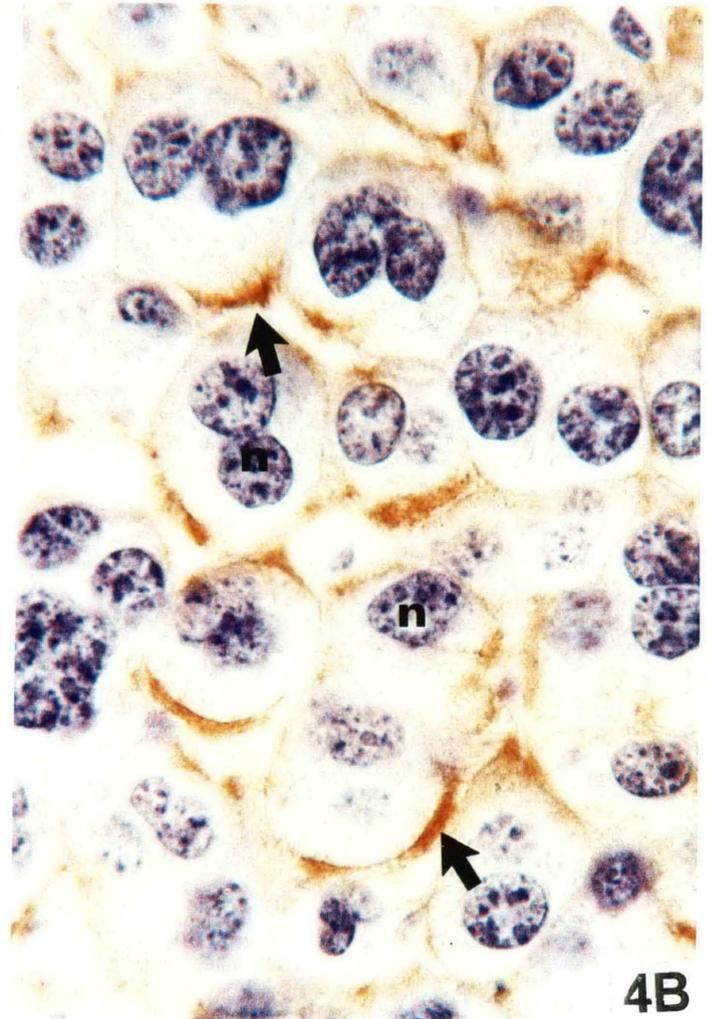
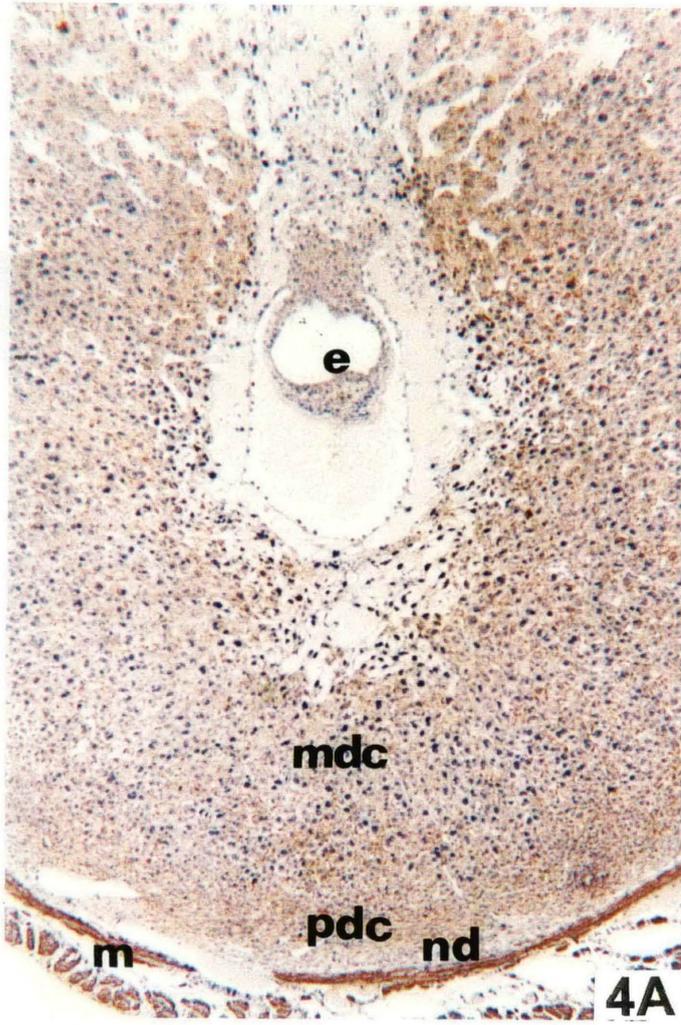


FIGURA 4

Sítio de Implantação - Sétimo dia de Gestação

- A) Corte transversal de um sítio de implantação. Observe o estágio avançado de implantação do embrião. **mdc** = região de células decíduas maduras; **pdc** = região de células predecíduas; **nd** = região de células não decíduas; **m** = miométrio. x 25.
- B) Grande aumento das células maduras. A positividade está restrita à periferia das células (**setas**). Nenhuma reação foi vista ao redor dos núcleos (**n**) ou pelo citoplasma. x950.
- C) Grande aumento da região mesometrial do sítio de implantação. Observe um início de positividade nos células estromais (**setas**), semelhante àquela encontrada no 5º dia de gestação, indicando que estas células estão se transformando em células decíduas.
lu = lúmen. x 950.



DISCUSSÃO

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

Como enfatizado na introdução deste trabalho, a transformação decidual ocorre de maneira centrífuga em relação à luz uterina, de modo que se estabelecem na espessura do endométrio, regiões contendo células em diferentes estágios de diferenciação. Os objetivos deste trabalho foram demonstrar os filamentos de desmina durante a decidualização e entender a distribuição destes filamentos intermediários nas regiões da decídua antimesometrial, utilizando os recursos de métodos imunocitoquímicos *in situ*.

No primeiro caso, podemos dizer que fomos felizes em adotar o procedimento imunocitoquímico com peroxidase, visto que os cortes tratados por este método preservam a reação por muito tempo, permitindo que se fizessem análises mais prolongadas ao microscópio sem a necessidade de obtenção de fotomicrografias imediatas. Se utilizássemos métodos de imunofluorescência, possivelmente obteríamos resultados semelhantes e que satisfariam os objetivos, porém a obtenção da documentação fotográfica seria mais complicada, uma vez que sabidamente os marcadores fluorescentes possuem limitado tempo de reação com a luz ultra-violeta. A vantagem de se utilizar marcadores fluorescentes conjugados aos anticorpos secundários é que reduz-se a possibilidade de aparecimento de coloração de fundo, ao passo que com o método da imunoperoxidase existe sempre a possibilidade de aparecer coloração inespecífica, devido à presença de peroxidases endógenas no tecido. Devido ao fato de o protocolo adotado e dos anticorpos terem reagido satisfatoriamente, este problema de coloração inespecífica não existiu, o que nos permitiu realizar com segurança a análise dos cortes tratados.

De fato o padrão da reação da imunoperoxidase apresentou-se homogêneo em todos os cortes de úteros nos diferentes dias estudados, ou seja, detectamos uma faixa de coloração que variava do castanho-claro ao

marrom-escuro. Este espectro de cores nos indicava uma variação não só na intensidade de coloração, mas também principalmente mostrava uma marcante variação na distribuição dos filamentos de desmina no citoplasma das células.

Reorganização na distribuição dos filamentos de desmina e aumento na intensidade de coloração imunocitoquímica nas células decíduais durante a decidualização

A reorganização na distribuição dos filamentos de desmina e o aumento na intensidade de coloração nas células decíduais entre o quinto e sétimo dia de gravidez, constituíram os resultados mais evidentes neste estudo. Como relatado nos resultados deste trabalho, os filamentos intermediários de desmina são expressados apenas pelas células decíduais e pré-decíduais como estruturas que participam do citoesqueleto.

Recentemente diversos autores têm demonstrado que o aumento na expressão de proteínas do citoesqueleto de células de origem mesenquimal acompanha o processo de diferenciação celular. Dentre estas células podemos mencionar células notocordais (Lehtonen et alii, 1995) e células musculares lisas e esqueléticas (Chou et alii, 1994; Vater et alii, 1994; Baldi e Reiser, 1995). Chou et alii (1994) relata em seus estudos que o aumento na expressão de desmina e alfa-actinina em células mesenquimais precursoras de células musculares lisas, é concomitante com uma reorganização do citoesqueleto. Em células mesenquimais muito jovens, mas já em curso de diferenciação em células musculares, a distribuição dos filamentos é inespecífica, tornando-se cada vez mais cristalina à medida que a célula amadurece, ou seja, os filamentos passam de uma disposição ao acaso para uma disposição perimetral nas células.

No início do processo de decidualização, ou seja, no 5ºDG observamos que os filamentos de desmina se concentravam nas cercanias do núcleo das células e também formavam um delicada malha espalhada

pelo citoplasma. Esta observação corrobora com os estudos ultra-estruturais em células deciduais de camundongos desenvolvidos por Zorn et alii (1990), que relataram a existência de filamentos intermediários formando feixes ou malhas frequentemente concentradas ao redor do núcleo. Estes autores contudo não identificaram os tipos de proteínas que formavam estes feixes. Neste sentido planeja-se dar continuidade ao estudo realizado, procurando identificar ao nível ultra-estrutural através de métodos imunocitoquímicos, quais os tipos de proteínas que constituem estes filamentos. Possivelmente estes feixes sejam formados por uma associação de filamentos de desmina e de vimentina, visto que as células deciduais mantêm a expressão de vimentina durante a decidualização (Glasser e Julian, 1986; Glasser et alii, 1987; Can et alii, 1995; Greca et alii, 1997).

A partir do 6ºDG, observamos que em algumas células iniciou-se um intenso processo de reorganização dos filamentos de desmina, caracterizado pela modificação na concentração de filamentos ao redor do núcleo para uma concentração mais periférica na célula. Paralelamente a este aspecto também observamos um aumento na intensidade da reação, pois o citoplasma apresentava uma malha de filamentos positivos mais evidente do que aquela observada nas células do 5ºDG.

No 7ºDG esta redistribuição e aumento na intensidade de coloração tornou-se ainda mais evidente, uma vez que as células deciduais não mais apresentavam concentração de desmina ao redor do núcleo e se concentravam apenas na periferia da célula formando cinturões. A malha de filamentos se apresentava mais corada do que a observada no 6ºDG. Estes dados sugerem fortemente que célula decidual durante o seu processo de diferenciação (entre o 5º e 7ºDG), aumenta a expressão de desmina ao mesmo tempo que reorganiza seu citoesqueleto.

Estas observações confirmam estudos publicados por Tachi et alii (1972), O'Shea et alii (1983), Welsh e Enders (1985), Zorn et alii (1990); Can et

alii (1995) e Greca et alii (1997). Estes autores relataram aumento na quantidade de filamentos intermediários durante a transformação de fibroblastos endometriais em células decíduais de roedores e humanos. Contudo apenas Zorn et alii (1990) e Greca et alii (1997) procuraram explicar o significado biológico deste fenômeno ao demonstrar a relação existente entre a organização dos filamentos intermediários e a sua associação com fagossomas contendo colágeno em células decíduais de camundongos, bem como sua relação com junções aderentes, uma vez que as células decíduais são extremamente ricas em junções celulares (Abrahamsohn e Zorn, 1993).

No 8ºDG contudo, observamos que desapareceu a malha de filamentos positivos e que a reação imunocitoquímica ficou restrita apenas na periferia das células, inclusive com fraca intensidade. A nossa interpretação para estes resultados é que, como a partir do 8ºDG as células decíduais maduras iniciam um processo de involução (Katz e Abrahamsohn, 1987), a expressão de desmina cessa completamente pelo fato das células terem atingido seu ápice de diferenciação.

A expressão de filamentos de desmina indica o início da decidualização

Vários autores já haviam relatado que durante a decidualização do endométrio de outros mamíferos, a expressão de desmina caracterizava o início da transformação dos fibroblastos endometriais em células deciduais de ratas e humanos (Glasser e Julian, 1986; Glasser et alii, 1987). Estes autores, baseados em análise bioquímica e de imunofluorescência, chegaram a conclusão que a expressão da proteína desmina é um marcador da decidualização dos fibroblastos endometriais. Até então os únicos sinais de decidualização descritos em camundongos, eram o aumento do volume citoplasmático dos fibroblastos endometriais e aumento do número de cisternas do retículo rugoso (Potts, 1968).

No presente estudo, pudemos não só confirmar as observações imunocitoquímicas realizadas pelos autores, como também podemos afirmar que a expressão de desmina realmente é indicativo do início da decidualização. Logo após o blastocisto ter entrado em contato com o epitélio uterino luminal e este ter sinalizado o estroma endometrial para iniciar o processo de decidualização, já se percebia com relativa facilidade uma positividade nas células deciduais mais próximas ao epitélio. No 7ºDG também foram observadas células pré-deciduais com sinais de positividade semelhantes às aquelas detectadas nas células deciduais maduras do 5ºDG.

Outra observação importante é que a partir do 8ºDG, os fibroblastos endometriais também passam a expressar desmina na região mesometrial. Esta observação confirma resultados obtidos por Abrahamsohn e Zorn (1993) que relataram o início da decidualização mesometrial a partir deste dia da gestação, sendo que a decídua mesometrial vai constituir a placenta hemocorial da camundonga (Rugh, 1968).

A partir destes dados fica claro que para determinar com segurança o início do processo de transformação decidual, é preferível basear-se na

expressão da desmina, do que somente em observações puramente morfológicas, principalmente quando se pretende realizar estudos baseados em cultivo de células decíduais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo imunocitoquímico dos filamentos de desmina durante a decidualização permitem as seguintes conclusões:

1) As células decíduais e pré-decíduais da decídua antimesometrial de camundongos são capazes de expressar filamentos intermediários constituídos pela proteína desmina.

2) Durante a decidualização ocorre um aumento na quantidade de filamentos de desmina, desde o dia 5 até o dia 7 da gestação.

3) No dia 8 da gestação ocorre uma importante diminuição na expressão desta proteína.

4) Juntamente com o aumento da quantidade de desmina, ocorre uma marcante redistribuição dos filamentos constituídos por esta proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, **166**:263-74, 1983.
- ABRAHAMSOHN, P.A. & ZORN, T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, **266**:603-28, 1993.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. 3rd Edition. Garland Publishing, Inc. New York & London, 1993
- ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. **Am J. Anat.**, **30**:297-371, 1972.
- BEVILACQUA, E.M.A.F. **Estudo ultra-estrutural da interação materno-embrionária durante o início da gestação da camundonga**. São Paulo, 1984. 162p. (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
- BALDI J.C. & REISER P.J. Intermediate filament proteins increase during chronic stimulation of skeletal muscle. *Exercise Sci., Sch. Health Phys. Educ. Recreation, Coll. Dent., Ohio State Univ., Columbus, OH 43210, USA* **J. Musc Research and Cell Motility**, **16(6)**: 587-594, 1995.
- CAN A.; TEKELIOGLU M.; BALTACI A. Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. **Placenta**, **16(3)**: 261-275, 1995.
- CHOU R.G.R ; STROMER M.H.; ROBSON R.M.; HUIATT T.W. Substructure of cytoplasmic dense bodies and changes in distribution of desmin and alpha-actinin in developing smooth muscle cells. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, **29(3)**: 204-214, 1994.
- De FEO, V.J. decidualization. In: R.M. ed. Cellular Biology of the Uterus., Amsterdam, North Holland, 1967, p.192-291
- ECKSTEIN, P. & ZUCKERMAN, S. Changes in the accessory reproductive organs of the nonpregnant female. In: Marshall's Physiology of Reproduction. London, Longmans, 1956, p. 565-72.
- FERREIRA L.R.L.; MOUSSATCHE N.; MOURA NETO V. Rearrangement of intermediate filament network of BHK-21 cells infected with vaccinia virus. **Arch. Virology**, **138(3-4)**: 273-285, 1994.

- FINN, A.C. The implantation reaction. In: R.M. Wynn, ed. *Biology of the Uterus*. New York, Plenum Press, 1977, p.245-308.
- FINN, C.A. & PORTER, D.G. *The Uterus*. Acton, U.K., Pub. Sciences Group, 1975.
- FINN, C.A. & McLAREN, A. A Study of the early stages of implantation in mice. *J. Reprod. Fert*, **13**:259-67, 1967
- FINN, C. A. & PORTER, D. G. *The Uterus*. Acton, U.K., Pub, Sciences Group, 1975
- GLASSER, S.R. & JULIAN, J.A. Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. *Biol. Reprod.*, **35**:463-76, 1986.
- GLASSER, S.R., LAMPELO, S.; MUNIR, M.I.; JULIAN, J. Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Differentiation*, **35**:132-42, 1987.
- GRECA, C.P.S.; OLIVEIRA, S.F.; ABRAHAMSOHN, P.A.; ZORN, T.M.T. Organization of desmin-containing intermediate filaments in mouse decidual cells. *Braz. J. Morphol. Sci*, **14(1)**:64, 1997.
- KATZ, S. **Estudo ultra-estrutural da decídua antimesometrial de camundonga durante sua involução**. São Paulo, 1981. 134p. (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
- KATZ, S. & ABRAHAMSOHN, P.A. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study. *Anat. Embryol.*, **176**:251-8, 1987.
- KISALUS, L.L.; HERR, J.C.; LITTLE, C.D. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first-trimester human decidua. *Anat Rec*, **218**: 402-15, 1987
- KREHBIEL, R.H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol. Zool.*, **10**:212-33, 1937.
- LEHTONEN E.; STEFANOVIC V.; SARAGA BABIC M. Changes in the expression of intermediate filaments and desmoplakins during development of human notochord. *Differentiation*, **59(1)**: 43-49, 1995.
- LUNDKVIST, O. Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. *Biol. Reprod.*, **18**:306-16, 1978.

- O' SHEA, J.D., KLEINFELD, R.G. and MORROW, H. A. Ultrastructure of decidualization in the pseudopregnant rat **J. Anat.**, **166**:271-98, 1983.
- POTTS, D.M. The ultrastructure of implantation in the mouse. **J. Anat.**, **103**:77-90, 1968.
- PSYCHOYOS, A. La réaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l'úterus. **C. R. Soc. Biol.**, **154**:1384-7, 1960.
- PSYCHOYOS, A. Perméabilité capillaire et décidualisation utérine. **C.R. Seances Soc. Biol. Fil.**, **252**:1515-7, 1961.
- RUGH, R. Normal development of the mouse, In: Rhoda, H. ed. The mouse. Minneapolis, Burgess, 1968, p.44-101.
- SNELL, G.D. The early embryology of the mouse, In: Biology of the laboratory mouse. New York, Dover, p.1-54, 1941.
- TACHI, C.; TAQCHI, S.; LINDNER, H.R. Modifications by progesterone of estradiol-induce cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. **J. Reprod. Fert.**, **31**: 59-76, 1972.
- VATER R.; CULLEN M.J.; HARRIS J.B. The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle in vivo. **Histochemical J.** **26(12)**: 916-928, 1994.
- WELSH, A. D. & ENDERS, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimerometrial decidua and degeneration, **Amer. J. Anat.**, **172**:1-29, 1985.
- ZORN, T.M.T.; OLIVEIRA, S.F.; ABRAHAMSOHN, P.A. Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidual cells. **J. Struct. Biol.**, **103**:23-33, 1990.