



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOÃO AUGUSTO RODRIGUES ALVES DINIZ

CARACTERIZAÇÃO DO SACO VITELINO E DECÍDUA EM CUTIAS
***Dasypsecta leporina* Linnaeus, 1758 NA FASE INICIAL DA GESTAÇÃO**

MOSSORÓ-RN
2024

JOÃO AUGUSTO RODRIGUES ALVES DINIZ

CARACTERIZAÇÃO DO SACO VITELINO E DECÍDUA EM CUTIAS
***Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758 NA FASE INICIAL DA GESTAÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira

MOSSORÓ-RN
2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

D585c Diniz, João Augusto Rodrigues Alves .
 Caracterização do saco vitelino e decídua em
 cutias *Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758 na fase
 inicial da gestação / João Augusto Rodrigues Alves
 Diniz. - 2024.
 66 f. : il.

 Orientador: Moacir Franco Oliveira.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
 do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência Animal, 2024.

 1. Decidualização. 2. Imunomarcacão. 3.
 Membranas extra-embrionárias. 4. Morfologia. 5.
 Roedores. I. Oliveira, Moacir Franco, orient. II.
 Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOÃO AUGUSTO RODRIGUES ALVES DINIZ

CARACTERIZAÇÃO DO SACO VITELINO E DECÍDUA EM CUTIAS
***Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758 NA FASE INICIAL DA GESTAÇÃO**

Tese apresentada ao Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 29/04/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes (UFRN)
Membro Examinador

Prof.^a Dr.^a Fernanda Loffler Niemeyer Attademo (CMA-ICMBio)
Membro Examinador

 **PHÉLIPE OLIVEIRA FAVARON**
Data: 02/07/2024 13:01:49-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prc

Membro Examinador

(EL)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO AUGUSTO RODRIGUES ALVES DINIZ nasceu no dia 23 de junho de 1991, na cidade de Princesa Isabel/PB. Coursou o ensino fundamental e médio no Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio Profº Cicero Rabêlo Nogueira (em Manaíra/PB), concluindo no ano de 2008. Iniciou o ensino superior em 2012, na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), onde se graduou em Medicina Veterinária, concluindo em 2017. Ingressou em 2018 no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal UFCG, concluindo no ano de 2019. Em 2020 iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Durante o período acadêmico, em nível de graduação, mestrado e doutorado, atuou nas áreas de morfofisiologia animal e reprodução animal voltados as espécies de animais domésticos e silvestres.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado a chance de realizar um sonho, por ter me dado forças e esperança a cada dia! A virgem Maria para quem recorri nos momentos mais difíceis durante esses anos de curso da graduação, pós-graduação e da minha vida.

Aos meus pais Maria de Lourdes Rodrigues Diniz e Vilmar Augusto Alves Diniz, pois sem eles não conseguiria ter chegado tão longe. Em especial a minha mãe por ter feito o máximo pelo os meus estudos e ser essa mulher forte que sempre me deu apoio quando precisei. A todos os seus esforços, Mãe, é por você!

Aos meus irmãos Mineia Rodrigues Diniz e Emanuel Gustavo Rodrigues Diniz que mesmo distantes nunca deixaram de me incentivar e acreditar no meu sonho. Ao meu cunhado Cícero e aos meus sobrinhos Heitor e Deborah.

A minha noiva Karol Reis por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, dos mais alegres aos mais difíceis. Obrigado por ser essa companheira que suporta meus dias ruins e que sempre me ajudou, quando estava mal. Obrigado meu amor!

Ao meu primo/irmão Dr. Danilo de Lima Rodrigues, agradeço pelo seu gesto generoso de me estender às mãos quando ninguém mais acreditava, e de ter me dado à chance de começar essa caminhada! Obrigado meu irmão! Serei eternamente grato a você. E toda sua família por terem me acolhido em seu lar, por toda sua hospitalidade e apoio.

Aos meus familiares, avós, tios, primos e amigos que sempre de alguma forma ajudaram na minha caminhada, muito obrigado! Ao meu sogro e minha sogra, Senhor Reginaldo Mendonça e a Senhora Marlucia Reis, por sempre me acolher em sua casa, quando precisei, meu muito obrigado!

Aos meu orientador, Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira que me acolheu como orientado e por todos os ensinamentos que me passou durante esses quatro anos. Através dele consegui me desenvolver como um melhor pesquisador, assim como seus ensinamentos me ajudaram a trilhar meu caminho como professor. Hoje posso dizer que tenho como exemplo, não só na carreira de professor e pesquisador, mas também com um bom ser humano. Meu muito obrigado por tudo, Prof. Moacir!

A todos os meus colegas de pós-graduação que fazem parte do grupo do LABMORFA, em especial a Carol Freitas e Igor Renno, que participaram ativamente nas pesquisas e por nossas pausas para o café! A todos os demais que estão e passaram pelo o laboratório, Radan, Eduardo, Herson, Rafael, Mariana e Rysonely. A Romário meu colega de doutorado com quem tive a honra de conviver durante esse período. E a todos meus colegas que tive o apreço de conviver durante meus anos de graduação e pós-graduação obrigado por tudo!

A UFRSA e a todos que fazem parte dela. Ao CEMAS, por oferecer todo o apoio para realizar parte da pesquisa, e a todos os funcionários que me ajudaram nesse período, Robson, Francisco, Almeida e Caubi, que sempre estiveram à disposição para ajudarem nas coletas. Muito obrigado a todos!

As minhas queridas Cutias, obrigado!

Ao Ministério da Educação (MEC) pela bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelo apoio e financiamento deste projeto.

Muito obrigado a todos vocês!

RESUMO

A utilização de espécies silvestre mostra-se importante para novas pesquisas, a fim de elucidar detalhes da morfologia de seus sistemas, tais como o sistema reprodutor, visando auxiliar em ações voltadas ao entendimento morfológico destas espécies e à conservação, tanto em vida livre como em cativeiro. Descrever a formação do saco vitelino e da decídua em cutias da espécie *Dasyprocta leporina*, na fase inicial de gestação, associando às alterações morfológicas das estruturas envolvidas durante essa fase. Seis fêmeas oriundas do CEMAS-UFERSA foram monitoradas 24 horas após a cópula, e o dia seguinte foi considerado o primeiro dia de gestação. As coletas foram realizadas nos dias 13, 14 e 15 de gestação, sendo os úteros gravídicos fixados em paraformaldeído a 8% por 72 horas. Após processamento histológico, cortes de 5 µm foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para todas as idades; para úteros com 15 dias de gestação, também foi utilizada a reação do Ácido Periódico de Schiff (P.A.S) e a imunohistoquímica, sendo, em seguida, analisados em microscópio de luz. No 13º dia, o blastocisto se implantou no lado antimesometrial do útero, sendo envolto por células estromais uterinas que se organizaram ao seu redor. No 14º dia, a membrana intramural entre o útero e o embrião começou a se romper. O saco vitelino parietal apresentou células fusiformes, enquanto o visceral tinha células cuboides eosinofílicas. No 15º dia, a membrana intramural estava quase completamente rompida, revelando um leito vascular entre o embrião e a decídua. O saco vitelino visceral ainda não exibia suas vilosidades características nessa fase. Com 15 dias de gestação, observou-se o blastocisto envolto por células decíduais. Na região decidual, as células mostraram positividade na coloração com P.A.S. Quanto à marcação com anticorpos de receptores de desmina e vimentina, verificou-se que na região da decídua, o citoplasma celular marcou de forma mais intensa para ambos os anticorpos. Nas células da região decidual, a progesterona marcou mais intensamente, enquanto para o estrógeno, a marcação foi mais intensa nas células da região pré-decidual. Este estudo caracterizou a formação do saco vitelino nas cutias, evidenciando o início da inversão entre os dias 14 e 15 de gestação. Além disso, identificou receptores hormonais de estradiol e progesterona, e filamentos intermediários como desmina e vimentina nas células decíduais, evidenciando as modificações das células uterinas durante a decidualização.

Palavras-chave: Decidualização. Imunomarcação. Membranas extra-embriônicas. Morfologia. Roedores.

ABSTRACT

The use of wild species proves to be important for new research, aiming to elucidate details of their morphology, such as the reproductive system, to assist in actions focused on understanding the morphological aspects of these species and their conservation, both in the wild and in captivity. Describe the formation of the yolk sac and decidua in agoutis of the species *Dasyprocta leporina* in the early stage of gestation, associating it with morphological changes in the structures involved during this phase. Six females from CEMAS-UFERSA were monitored for 24 hours after mating, and the following day was considered the first day of gestation. Collections were made on days 13, 14, and 15 of gestation, with gravid uteri fixed in 8% paraformaldehyde for 72 hours. After histological processing, 5 µm sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for all ages; for uteri with 15 days of gestation, Periodic Acid-Schiff (P.A.S) reaction and immunohistochemistry were also used, and then analyzed under a light microscope. On the 13th day, the blastocyst implanted on the antimesometrial side of the uterus, surrounded by uterine stromal cells that organized around it. On the 14th day, the intramural wall between the uterus and the embryo began to rupture. The parietal yolk sac presented spindle-shaped cells, while the visceral had eosinophilic cuboidal cells. On the 15th day, the intramural layer was almost completely ruptured, revealing a vascular bed between the embryo and the decidua. The visceral yolk sac did not yet exhibit its characteristic villi at this stage. With 15 days of gestation, the blastocyst was observed surrounded by decidual cells. In the decidual region, cells showed positivity in staining with P.A.S. As for the staining with desmin and vimentin antibodies, it was found that in the decidual region, the cellular cytoplasm marked more intensely for both antibodies. In decidual region cells, progesterone marked more intensely, while for estrogen, marking was more intense in the predecidual region cells. This study characterized the formation of the yolk sac in agoutis, highlighting the onset of inversion between days 14 and 15 of gestation. Additionally, it identified hormonal receptors for estradiol and progesterone, and intermediate filaments such as desmin and vimentin in decidual cells, evidencing the modifications of uterine cells during decidualization.

Keywords: Decidualization. Immunostaining. Extraembryonic membranes. Morphology. Rodents.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>).....	19
----------	---	----

CAPÍTULO II

Figura 1	(A) Embryo (circle) of a red-rumped agouti (<i>Dasyprocta leporina</i>) implanted in the uterus, 13th gestation day. The embryo is located in an antimesometrial position and one of its poles contains an immature subplacenta (arrow); (B) Note: Intramural membrane (black arrow), inner cell mass (asterisk) and trophoctoderm cells (red arrow). Cells are distributed around the intramural membrane, forming a barrier limited by the intramural membrane; (C) Beginning of the bilaminar embryo differentiation process through the hypoblast (black arrow) and epiblast (red arrow) layers. Note the blastocoele (asterisk); (D) Indicates the distance between uterine cells (Ut) and trophoblastic cells (T) (also highlighted in image C by the square), which are limited by a thin layer of intramural membrane squamous cells (red arrow). Staining: HE. Bars: 100 µm, 20 µm, 20 µm and 10 µm, respectively.....	42
Figura 2	(A) Red-rumped agouti (<i>Dasyprocta leporina</i>) embryo on the 14th gestation day. The following are observed: the subplacenta (SP – red arrow) close to the main placenta (P – yellow arrow), the blastocyst (B) at the beginning of its differentiation process and the presence of extravasated maternal blood (MB) around the implantation site. Note the presence of a tenuous membrane delimiting the entire surroundings of this region (intramural membrane); (B) Layer of cubic trophoctoderm (TE) cells surrounding the blastocyst (asterisk). Formation of the visceral yolk sac (VYS) and separation of the maternal blood (MB) from the embryo through the intramural membrane (IM); (C) Differentiation of the visceral (VYS) and parietal yolk sac (PYS) and trophoctoderm layer (TE) on the parietal layer of the yolk sac and the presence of the main placenta (P) in its initial development phase containing giant trophoblastic cells (circle); (D) Approximation of the subplacenta (SP). The syncytiotrophoblast is arranged in the form of cords that return towards the main placenta (P). Note: cells of a cytotrophoblastic nature (circle) and	

giant trophoblastic cells (arrow). Color: HE. Bars: 100 µm, 20 µm, 20 µm and 20 µm, respectively..... 43

Figura 3 (A) Red-rumped agouti embryo (*Dasyprocta leporina*) implanted at 15 days of gestation. The ectoplacental cone (EPC) is located at one of the poles and the embryo (E), on the opposite pole. A large area filled with maternal blood (MB) and the presence of an extensive area composed of cells making up the decidua basalis (DB) and its relationship with the uterus (Ut) are noted around the (EPC); (B) The embryonic pole containing the embryo (E) with the amniotic cavity already present (AC) and the exocoelomic cavity (EXC) formed by the trophectoderm (TE) can be seen towards the ectoplacental cone. MB = maternal blood); (C) Formation of the vitelline cavity (CV) composed of the visceral yolk sac (SVV) and parietal and chorionic cells proper or the trophoblast (circle) differentiating to give rise to the placenta. TE = trophectoderm. (D) Trophectoderm cells (TE) superimposed on the parietal yolk sac (PYS), next to the visceral yolk sac (VYS), giving an appearance of a trilaminar layer, in addition to the presence of decidua capsularis cells (circle) between maternal blood cells. HE staining..... 45

CAPÍTULO III

Figura 1 Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) uterus on the 15th gestation day. The embryo (E) implanted in the implantation site is evident around a blood gap of maternal blood (MB) and surrounded by more eosinophilic decidua basalis cells (DB), differentiated from other uterine stroma cells (Ut). The embryonic pole is in the antimesometrial direction (*). HE staining..... 57

Figura 2 (A and B) - Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) uterus on the 15th gestation day. The pre-decidual region is evident, containing pre-decidual cells (CPD). The the decidual region containing mature decidual cells (DC) close to the implantation area; (C and D) Positive PAS staining is noted close to decidual cell nuclei (Arrows). Bars: 100 µm, 20 µm, 20 µm and 10 µm, respectively. HE staining..... 58

Figura 3 (A) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) decidual cells on the 15th gestation day, stained for desmin. Note more evident staining in the decidual region (arrows); (B) Strong vimentin staining was labeling in pre-decidual (PDC) and mature decidual (DC) cells, located in the pre-decidual and decidual regions, respectively; (C) Progesterone staining in mature decidual cells, in the decidual region (arrows); (D) Estrogen staining in the pre-decidual and decidual region, in pre-decidual (PDC) and decidual (DC) cells. Insets in the photomicrographs represent negative controls. Bars: 100 μ m, 100 μ m, 100 μ m and 100 μ m, respectively..... 59

Figura 4 (A) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) decidual cells on the 15th gestation day stained with hCG, with more evident staining noyted in the decidual region (DC) compared to the pre-decidual cell region (PDC); (B-D) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) embryo (E) on the 15th gestation day; (C and D) Embryonic trophoblastic cells (T) stained with hCG, forming a trilaminar layer next to the visceral yolk sac (VYS). Bars: 100 μ m, 100 μ m, 20 μ m and 10 μ m, respectively..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nas imunomarcações.....	57
----------	---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diaminobenzidina
Dr	Doutor
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HCG-H	Gonadotrofina coriônica humana - hiperglicosilado
HE	Hematoxilina-eosina
HRP	Horseradish peroxidase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IHQ	Imuno-histoquímica
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PL-II	Lactogênio-II da placenta
PL-Is	Lactogênio placentário-I α
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA.....	17
3	HIPÓTESE	18
CAPÍTULO I		
1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS	19
1.2	IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E DECIDUALIZAÇÃO.....	20
1.3	SACO VITELINO	24
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
	REFERÊNCIAS	29
 CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DO SACO VITELINO EM CUTIAS (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758) NA FASE INICIAL DA GESTAÇÃO		
RESUMO		
	INTRODUÇÃO.....	39
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
	RESULTADOS.....	41
	DISCUSSÃO.....	45
	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
 CAPÍTULO III: A DECÍDUA DE CUTIA (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758) NA FASE INICIAL DE GESTAÇÃO		
RESUMO		
	INTRODUÇÃO.....	54
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
	RESULTADOS.....	57
	DISCUSSÃO.....	60
	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos conhecimentos sobre a anatomia, a fisiologia e sobre comportamentos de novas espécies animais tornar-se necessário, uma vez que ainda há muitas informações sobre a biologia de mamíferos, ainda não completamente consolidadas. Com isso, a utilização de espécies silvestre mostra-se importante para novas pesquisas, a fim de elucidar detalhes sobre morfologia dos seus sistemas, tais como os do sistema reprodutor, visando auxiliar em ações voltadas a caracterização morfológica da espécie.

Por exemplo, algumas espécies de roedores têm sido estudadas por oferecerem ampla variedade em suas funções, já que são espécies com diversas adaptações ecológicas, que permitem que estes suportem diferentes tipos de ambientes (ANVAROVNA et al., 2024).

Estudos realizados em roedores do continente sul-americano, mostram que há semelhanças entre a placenta desses animais com a de seres humanos (RODRIGUES et al., 2003). Desta forma, pesquisas que abrangem estudos com a placenta e seus anexos fetais, mostram-se importantes quando, principalmente, têm em vista estabelecer o uso da espécie como modelos experimentais (CONCEIÇÃO et al., 2008).

Os roedores representam vantagens para os pesquisadores, pois possuem período gestacional curto e um número maior de filhotes em cada gestação. Além disso, requerem espaços menores e um baixo custo para sua criação quando comparados com algumas espécies domésticas como ovelhas, gatos e cães, que possuem alto custo de criação e uma legislação mais rigorosa para seu uso como modelos experimentais (CARTER, 2007).

A cutia representa um roedor de fácil reprodução, que tem grande potencial para servir como modelo experimental por apresentar uma placenta com características de interesse para estudos de placentação, somando-se a isto a facilidade de sua criação em cativeiro associado aos baixos custos de manutenção.

A cutia (*Dasyprocta leporina*) é um roedor que pertence à ordem Rodentia e a família Dasyproctidae. Identificada por ser um roedor de médio porte, possui uma distribuição ampla, sendo encontrada em várias regiões do território brasileiro. São animais que apresentam cor amarelo-alaranjada, corpo relativamente comprido, e membros pélvicos longos. (OLIVEIRA; BONVICINO, 2011; LANGE; SCHIMIDT, 2014).

Quanto ao processo embrionário de algumas espécies animais, antes de ocorrer a formação da placenta é preciso que o embrião implante no útero. Para que esse processo se estabeleça, deve haver no útero condições que garantam a sobrevivência do embrião. Para tanto, o epitélio uterino sofre invasão por células trofoblásticas com o intuito de garantir que o

embrião seja implantado e se inicie a gestação (OLIVEIRA, 2004).

Roedores como cutias e pacas possuem uma placenta vermelha, relacionada centralmente com a subplacenta e lateralmente com a decídua basal (CONCEIÇÃO et al., 2008). A decídua é formada por células modificadas do mesométrio, chamadas células deciduais, que desempenham funções importantes no desenvolvimento da interface entre o tecido decidual e a placenta, especialmente na vascularização (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014).

Em roedores como os ratos, após a implantação do embrião, as células estromais próximas ao embrião na região anti-mesometrial do útero iniciam o processo de decidualização, facilitando a acomodação do embrião. Posteriormente, as células estromais na região mesometrial também passam por decidualização, formando a área decidual mesometrial, que ajuda a preparar o útero para a placentação (ZHAO; ZHANG; LIU, 2017).

A decidualização provoca alterações ultraestruturais nas células uterinas, moduladas por hormônios reprodutivos que reestruturam tanto o citoplasma quanto o núcleo, resultando em células aumentadas, com menor espaço extracelular, acúmulo de glicogênio, e organização de filamentos intermediários como vimentina e desmina, essenciais no processo de diferenciação em células deciduais (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014).

Outro aspecto a ser levado em consideração no tocante aos roedores caviomorfos, são suas estruturas embrionárias anexas, no qual o saco vitelino tem aspectos distintos de outras espécies mamíferas. Esse saco vitelino tem como função primária nutrir o embrião até o momento em que esteja desenvolvido o suficiente para se manter, tanto nas espécies domésticas com nos roedores. Além de ser considerado como o único local de troca placentária até a formação dos membros do feto, por volta da segunda semana de gestação em ratos. Em algumas espécies de roedores, o saco vitelino sofre um processo de inversão, em um determinado período da gestação, em relação a placenta principal, no qual pode começar antes mesmo de iniciar o estágio de desenvolvimento embrionário (JOLLIE, 1990).

Esse tipo de inversão ocorre na maioria dos roedores, onde o saco vitelino se inverte sobre a placenta, resultando na adição da parte visceral do saco vitelino ao lado fetal da placenta corioalantóica, sobreposta pela parte parietal, formando um tipo de placenta vitelínica anexada à placenta corioalantóica (CONCEIÇÃO et al., 2008; MIGLINO et al., 2008).

Embora vários estudos tenham sido desenvolvidos sobre os a placentação de cutia e em outros roedores em uso como modelos experimentais (RODRIGUES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017), ainda não foi completamente elucidado como acontece a dinâmica da inversão do saco vitelino e suas funções nesta espécie.

2 JUSTIFICATIVA

Com o intuito de auxiliar nos estudos sobre a biodiversidade e conservação de espécies silvestres, estudos têm sido realizados para proporcionar a manutenção dessas espécies tanto em vida livre, como em cativeiro, respeitando as particularidades de cada espécie.

Estudos sobre a placentação de animais, em especial, com roedores como modelos experimentais têm sido utilizados dada a grande similaridade desses animais com o modelo de placentação humano.

Além disso, o saco vitelínico tem sido colocado como um anexo embrionário de importância secundária na gestação mesmo em roedores caviomorfos. Contudo, representa uma estrutura evolutivamente importante, pois em roedores permanecem como uma membrana funcionalmente ativa até o final da gestação. Este aspecto, nos levou a investigar aspectos de sua inversão na espécie na tentativa de poder estabelecer vinculações evolutivas com outras espécies.

Assim, tendo conhecimento de vários estudos com modelos de placentação de roedores, mas poucos deles com nenhuma vinculação ao primeiro terço de gestação, logo após a implantação embrionária e sua relação com a síntese de hormônios relacionados a gestação e a modificação celular durante o processo de decidualização uterina em roedores, buscou-se, com base nestas proposições desenvolver este trabalho que tem como finalidade descrever a dinâmica do desenvolvimento do saco vitelino e a expressão de receptores hormônios ovarianos e marcadores teciduais durante o terço inicial de gestação, permitindo que se possa correlacionar aspectos do desenvolvimento ontogênico da espécie com outras do mesmo grupo.

3 HIPÓTESES

- O saco vitelino de cutias é formado por duas camadas, uma porção representada pelo saco vitelino parietal e outra pelo saco vitelino visceral;
- Em cutias, ocorre o processo de inversão do saco vitelino e esse acontece antes do décimo quinto dia de gestação.
- Receptores hormonais de progesterona e estrogênio estão presentes nas células decíduas durante o processo de decidualização uterina na fase inicial da gestação em cutias;
- As células uterinas sofrem influências de hormônios gonadotróficos durante o processo de decidualização em cutias;
- As células deciduais em cutias são modificadas por atuação de filamentos intermediários, como desmina e vimentina.

CAPÍTULO I

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. 1 ASPECTOS BIOLÓGICOS

A cutia (*Dasyprocta leporina*) é uma espécie de roedor pertencente à ordem Rodentia, da família Dasyproctidae e do gênero *Dasyprocta* (Figura 1). Esta espécie, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), se encontra na categoria de menos preocupação (LC), devido a situação estável na natureza e sua ampla distribuição no continente americano (EMMONS; REID, 2016).

São animais terrestres encontrados em todo território brasileiro, caracterizadas pelo seu rápido povoamento na natureza, embora seja uma espécie que tem o costume de não se afastarem muito do seu local de nascimento, e são bastante encontradas em regiões de florestas com coberturas menos densa, porém podem ser encontradas em vários outros tipos de vegetação e não muito perto de curso de água (LANGE; SCHIMIDT, 2014; EMMONS; REID, 2016).



Figura1: Cutia (*Dasyprocta leporina*).

Fonte: Centro de Multiplicação de Animais Silvestres - CEMAS/UFERSA.

No tocante aos seus hábitos alimentares, as cutias são caracterizadas como frugívoros e bons dispersores de sementes na mata por conta da sua dieta rica em alimentos como folhas, raízes, frutos e sementes, encontrados sob o solo ou enterrados no interior da mata (LANGE; SCHIMIDT, 2014; EMMONS; REID, 2016).

São roedores de porte médio, com peso que varia de 4 a 7 kg, em alguns casos. Possuem longos membros pélvicos, membros torácicos curtos, com unhas parecidas com cascos. Seu dorso é curvado e provido de pelagem na região mais caudal forte e hipertrofiada que em situações de estresse ou fuga se eriçam facilmente (OLIVEIRA; BONVICINO, 2011). Dispõem de um longo par de dentes incisivos que auxiliam na hora da alimentação no momento de abrir alimentos mais duros (HOSKEN; SILVEIRA, 2001).

O sistema reprodutor da cutia fêmea é composto por um par de ovários, duas tubas uterinas, dois cornos uterinos, um útero, parcialmente duplo, vagina e vulva com a presença do clitóris e de espículas. Este útero na região do colo, na sua parte cranial, é septado dando origem a dois óstios cervical interno, entretanto, na sua parte mais caudal esse septo desaparece formando apenas um óstio cervical externo (OLIVEIRA et al., 2019). Essa característica do útero resultou em uma proposta de classificação feita por Moura et al. (2003) no qual o útero da cutia não seria do tipo duplo, mas, parcialmente duplo pelo fato de ser septado apenas na sua parte cranial.

São animais poliétricas contínua, pois se reproduzem ao longo de todo o ano, e as fêmeas jovens atingem o período de maturidade entorno dos 6 meses de idade (OLIVEIRA; BONVICINO, 2011; LANGE; SCHIMIDT, 2014). Esses animais possuem um ciclo reprodutivo que dura em média 30 dias, com fases características de diestro, metaestro, proestro e estro, seu período gestacional dura entre 104 e 120, e durante a sua gestação pode ocorrer nascimento de 1 a 3 filhotes, as quais permanecem em lactação por 4 semanas (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997; OLIVEIRA; BONVICINO, 2011; LANGE; SCHIMIDT, 2014; CAMPOS et al., 2015; CARREIRO et al., 2018; DINIZ et al., 2019).

1. 2 IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E DECIDUALIZAÇÃO

Após a fecundação, que marca o início da gestação, o zigoto começa a passar por sucessivas divisões celulares chamadas clivagens. Logo após ser fecundado e ocorrer a primeira clivagem, que resulta na formação de células denominadas blastômeros, o zigoto passa a ser chamado de embrião, ainda envolto pela zona pelúcida. Esse embrião passará por mais algumas séries de divisões mitóticas até formar uma massa celular com aproximadamente 32 células em seu interior, fase correspondente a mórula (CROSS; WERB; FISHER, 1994; TAO et al., 2002; SETTI et al., 2018).

Durante o percurso que o embrião tem até chegar ao útero outros processos acontecem e ao longo dessas mudanças os blastômeros começam a se alinhar uns contra os outros em um

processo de compactação celular. Já em seu estado de blastocisto inicial suas células tornam-se mais específicas, circundado por uma camada extrema de células denominadas de trofoblastos e no seu interior formando uma massa celular, os embrioblasto (CROSS, 1998). No momento em que o embrião entra na cavidade uterina um líquido presente no útero atravessa a zona pelúcida e preenche a cavidade, com esse líquido é formado a cavidade blastocística. Durante esse período pré-implantacional o embrião permanece flutuando no líquido uterino até o momento que perde a zona pelúcida, o que possibilita o aumento de seu volume e o início da aproximação do epitélio uterino (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013).

Este líquido uterino é produzido pelas glândulas uterinas que têm seu metabolismo intensificada pela atuação da progesterona e do estrógeno, tornando-as maiores, mais ativas e ramificadas que além de penetrar na cavidade do embrião, tem a função de auxiliar na sua nutrição antes da implantação (RAMOS et al., 2015; MARTINS et al., 2020).

No período pré-implantacional, o útero é preparado para que assegure boas condições para abrigar o embrião. Esse período pode estar relacionado a presença de hormônios (OLIVEIRA, 2004) como o estrógeno e a progesterona que são produzidos no ovário durante as fases do ciclo estral (CROSS; WERB; FISHER, 1994). A progesterona atua estimulando mudanças no endométrio reduzindo a atividade de contração da parede do útero, permitindo desta forma a fixação do embrião no útero (PTASZYNSKA, 2010; BULLETTI et al., 2022).

A presença do estrógeno na circulação embora esteja ligada principalmente a indução do estro ao promover a secreção de GnRH na corrente sanguínea, o que por sua vez induz a liberação de LH e estimulação da maturação do ovócito e a ovulação (D'AVILA et al., 2019), a sua presença na circulação durante o processo pré-implantacional estar relacionada à ativação dos blastocistos através da liberação de metabolitos do tipo catecolestrógenos que favorecem a aproximação do embrião ao endométrio, facilitando a invasão trofoblástica no epitélio (PARIA; DAS; DEY, 1997).

A progesterona é mantida na circulação devido aos estímulos do corpo lúteo, pela ação do LH na circulação. Em humanos a gonadotrofina coriônica humana (hCG) que é sintetizada pela as células trofoblástica, tem uma ação semelhante ao LH na manutenção do corpo lúteo, assim como a sua presença na circulação pode indicar que o embrião foi implantado (LA PAZ et al., 2007; MEDEIROS; NORMAN, 2006; PAREJA et al., 2010)

Nos roedores a manutenção do corpo lúteo e a produção de progesterona fica a cargo da prolactina, hormônio produzido pela a hipófise anterior, que se mantém em altas taxas na circulação até 12º dia de gestação com picos de secreção duas vezes ao dia, sendo muito importante nessa manutenção, no entanto decresce após 12º de gestação e desta forma os

hormônios lactogênicos (PL-Is e PL-II) ficam a cargo manter o corpo lúteo para a secreção de progesterona na circulação (SOARES, 2004).

A atuação hCG durante o momento pré-implantação e pós-implantação são fundamentais para o sucesso da implantação embrionária. O hCG possui 15 variantes, dentre estas, cinco são sintetizadas pela placenta durante a gravidez e pode-se destacar duas variantes como fundamentais para a identificação da implantação embrionária bem-sucedida, são elas o hCG regular e hCG-hiperglicosilada (hCG-H) (COLE, 2009; COLE; DUTOIT; HIGGINS, 2011). O hCG-H é produzido antes que ocorra a implantação o que pode identificar uma gestação mais precocemente do que o hCG regular, sendo diferenciado deste nos exames pelo seu peso molecular (SASAKI; LADNER; COLE, 2008).

Em uma revisão sobre a biologia e detecção de hCG em humanos, Cole (2009) explica a diferença dos locais que em são produzidas essas variantes do hCG. A produção de hCG regular acontece pela as células vilosas do sinciciotrofoblastos, sendo a principal variante produzida durante o período de gestação. Já o hCG-H é produzido pela as células extravilosas invasivas do citotrofoblasto, sendo umas das principais células presente no momento implantacional, além de ser a variante do hCG com maior produção durante a primeira semana de gestação.

Além do fator hormonal estar relacionado às mudanças das características morfológicas do epitélio uterino, outros fatores também podem atuar nesse período pré-implantacional, auxiliando num processo bem sucedido, tais como proteínas, citocinas e polímeros de glicosaminoglicanos (MAS et al., 2008; SOARES; TORRES-PADILLA; ZERNICKA-GOETZ, 2008; OLIVEIRA et al., 2015).

Entre o final da primeira e começo da segunda semana de gestação a implantação propriamente dita começa através da interação de células do blastocisto com células do endométrio uterino. As células trofoblásticas de forma invasiva iniciam uma degradação no epitélio endometrial gerando uma invasão do tecido conjuntivo materno, ocorrendo assim uma das primeiras interações feto/maternal (OLIVEIRA, 2004; CORTES, 2012; HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Em primatas e roedores, este processo de invasão acontece a partir da adesão das células trofoblásticas do embrião no endométrio que começam a se diferenciar e proliferar em duas camadas de células. Uma camada celular são de citotrofoblasto que é a mais interna e uma outra camada composta por células do sinciciotrofoblastos, mas externa, formada por uma massa multinucleada originaria da fusão de células (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013).

Já as células do embrioblasto, no interior do blastocisto, passam também por uma diferenciação originando uma placa bilaminar de células, formadas por uma camada de hipoblásto, que correspondem a células pequenas e cuboides voltadas para a cavidade blastocística e que darão origem a uma fina membrana que revestirá a vesícula vitelínica primitiva. A outra camada é formada por células epiblasticas de formato colunar que futuramente se desenvolverá formando o assoalho da cavidade amniótica (SADLER, 2016).

A concretização da gravidez em tanto nos roedores como em primatas depende crucialmente da implantação e decidualização dos embriões. Após a fixação do embrião, no endométrio uterino, as células do estroma que envolvem o blastocisto começam a proliferar e a se diferenciar em células decíduais, facilmente diferenciada por serem grandes e redondas, um processo conhecido como decidualização (LIN et al., 2018). Essas células são produtoras de proteínas, que após esse processo o endométrio passa a ser chamado de decídua, na qual pode ser separada em três partes, a decídua basal que está entre o embrião e o miométrio, a decídua capsular entre o embrião e o lúmen uterino e por última a decídua parietal que está em contato com a mucosa uterina (ENDERS, 1991; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Esse tecido decidual, estimulado por hormônios como progesterona e estrógeno, auxilia no processo de implantação. Após esse estágio, ele envolve completamente o embrião, formando uma decídua basal na região mesometrial e uma decídua capsular na região antimesometrial. Esses eventos são essenciais na interface materno-fetal para um desenvolvimento fetal adequado (ORWIG; RASMUSSEN; SOARES, 1997; SOARES, 2004; LU et al., 2022).

A ação hormonal nas células uterinas resulta em uma readequação ultraestrutural de sua forma. Essas modificações estão relacionadas ao seu tamanho, deixando mais arredondadas, assim como seu núcleo, redução do espaço extracelular, síntese de macromoléculas, acúmulo de glicogênio e lipídios e filamentos intermediários (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993).

Dentre esses filamentos podemos destacar a vimentina como filamento principal, derivado de células do mesoderma embrionário, e a desmina observada em células musculares (KORGUN et al., 2007). Além disso, marcações de filamentos de vimentina e desmina são expressos em células decíduais de ratos e humanos (CAN; TEKELİİOĞLU; BALTACI, 1995; OLIVEIRA et al., 2000).

A desmina é um tipo de filamento que se acumula em corpos densos ao redor dos núcleos. Ela pode ser identificada por seus longos filamentos isolados, os quais interagem com outros filamentos da mesma classe, como a vimentina (COSTA, et al., 2004). Já a vimentina é amplamente difundida nas células do estroma uterino durante os estágios iniciais de

implantação sendo um dos principais filamentos intermediários desempenhando um importante papel na estabilidade celular, integridade e receptividade uterina (KORGUN et al., 2007).

1.3 SACO VITELINO

Após o processo da implantação, simultaneamente ao desenvolvimento embrionário ocorre a formação dos seus anexos fetais, os quais incluem as membranas extraembrionárias, a placenta e o cordão umbilical (OLIVEIRA, 2004). Essas membranas fetais colaboram com o endométrio na formação da placenta, desta forma possibilitam trocas fisiológicas entre o feto e mãe (ROBERTS; GREEN; SCHULZ, 2016).

Nas espécies animais, os aspectos morfológicos das membranas fetais e da placenta podem variar, embora em roedores haja uma persistência de estruturas extraembrionárias como o saco vitelino visceral, o âmnio e a placenta até o final da gestação (CROSS, 1998).

Apesar da persistência do saco vitelino nos roedores, em alguns mamíferos domésticos como suínos, ruminantes e equinos essa estrutura tem um tempo de funcionalidade muito curto e pode ser classificada como uma estrutura transitória, pois regride logo após a implantação (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012) sendo considerada muito importante no período pós-implantacional com a função de absolver nutrientes vindos do sangue materno (CROSS; WERB; FISHER, 1994).

Considerando a importância dessa estrutura que se origina a partir da camada endodérmica associada a um mesênquima vascularizado que inclui vasos vitelinos, o saco vitelino em roedores desempenha um papel crucial. Esta estrutura substitui, no mesmo local, o córion, formando assim a placenta vitelina, que é reconhecida como a membrana embrionária mais externa. Já em espécies como os primatas, essa estrutura é rudimentar e não participa de trocas materno-fetais. Por sua vez, em carnívoros ocorre uma fusão com o cório no qual se utiliza dos vasos vitelinos para a troca materno-fetal (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Em sua primeira conformação celular, ainda no blastocisto, o saco vitelino dos roedores é considerado uma estrutura bilaminar, composta de células trofoblásticas e uma única camada de células endodérmicas, o hipoblásto, que se proliferam da camada interna de massa celular do polo embrionário, mas que posteriormente torna-se uma estrutura trilaminar, com função primária de nutrir o embrião até o momento em que ele esteja bem desenvolvido e tenha a capacidade de se nutrir (JOLLIE, 1990).

Em estágios iniciais da gestação, em cutias, é visto a anexação do saco vitelino visceral na placenta corioalantóica, do lado fetal, e sendo coberta por sua camada parietal. Além disto,

o saco vitelino abrange, em partes, a placenta corioalantóide e a zona de crescimento citotrofoblástica. Estruturalmente a endoderme do saco vitelino tem característica plana, formada por células colunares e a sua localização, por conta da sua forma invertida, fica situada adjacente ao epitélio luminal endometrial. Já a vascularização do mesoderma, na fase inicial, ocorre pelos vasos fetais e um sistema de anel fibrovascular, que acontece próximo a placenta corioalantóica (MIGLINO et al., 2008).

De acordo com Haar e Ackerman (1971) a camada de células endodérmicas do saco vitelino parietal possuem células de núcleos ovais e de contornos achatados e nucléolos proeminentes, além de estarem ligados à membrana de Reichert formando um revestimento descontínuo de células no decorrer da cavidade do saco vitelino. Enquanto que as células endodérmicas presentes no saco vitelino visceral são mais colunares, com um nucléolo de extensão moderado e um núcleo basal irregular. Ainda de acordo com os autores é visto que a região apical dessas células direcionadas para a cavidade do saco vitelino está caracterizada por inúmeras microvilosidades.

Em espécies de roedores como o mocó a fixação do saco vitelino visceral ocorre em uma camada de tecido conjuntivo próximo ao disco placentário, e a parte do saco vitelino parietal cobre lateralmente a placenta. Esse epitélio de células colunares, repousa em uma membrana de Reichert e sob elas é encontrada uma camada de células do sincício marginal e espongiotrofoblastos (OLIVEIRA et al., 2006).

Em pesquisas sobre a placentação de capivaras, cutias e pacas, Miglino et al. (2002) observaram que estruturalmente o saco vitelino possui vilosidades digitiformes que ocasionalmente podem se ramificar, sendo observado nas cutias que essas vilosidades são bastante alongadas. O epitélio dessas vilosidades, nessas três espécies, está recobrimo um núcleo mesenquimal e o tipo de epitélio dessas vilosidades é do tipo colunar simples, na paca, já na capivara e cutias são células do tipo prismáticas com seus núcleos em posições apicais.

No início do desenvolvimento placentário dos mamíferos, forma-se uma placenta coriovitelina pela fusão do saco vitelínico com o córion, sendo vascularizada por vasos sanguíneos vitelínicos. Em várias espécies, incluindo roedores, essa estrutura é persistente e pode sofrer inversão parcial ou total das camadas germinativas (CARTER et al., 2004).

Este processo de inversão das camadas germinativas resulta em levar a camada endodérmica, composta de hipoblásto embrionário, sobre a camada ectodérmica, de células epiblasticas. Este processo ainda resulta na formação, por cavitação, do disco embrionário interno e da formação da cavidade amniótica por conta da conversão da massa celular interna (JOLLIE, 1990).

A inversão do saco vitelino é uma característica bem marcante no desenvolvimento das membranas fetais nas espécies de roedores, sendo observadas em mais da metade das famílias desta ordem. Considerando seus aspectos evolutivos a ordem Rodentia apresenta uma maior evolução no desenvolvimento e na sua forma de inversão, sendo caracterizada como espécies com uma inversão completa ou total. Entretanto, em espécies de diferentes ordens, como coelhos (Lagomorpha), tatus (Dasypodidae), morcegos (Microchiroptera) e algumas poucas espécies da ordem Insectivora, apresentam uma forma mais primitiva no processo de inversão do saco vitelino, ocorrendo apenas uma inversão parcial desta membrana (MOSSMAN, 1987).

Dentre as espécies da ordem Rodentia o esquilo é o que apresenta um desenvolvimento mais primitivo da inversão do saco vitelino, sendo sua inversão caracterizada como incompleta ou de forma parcial, das suas camadas germinativas, onde não há uma desintegração da onfalopleura bilaminar, persistindo até o final da gestação (MOSSMAN; WEISFELDT, 1939; MOSSMAN, 1987).

Em estudos a fim de elucidar fatores relacionados à dinâmica de inversão do saco vitelino, Vale et al. (2013) com auxílio de técnicas morfológicas e análises por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, estudaram sacos gestacionais de preás e nas suas observações verificaram que no décimo quarto dia de gestação ocorre a inversão do saco vitelino. Neste estudo foi possível observar uma desorganização da estrutura das células parietais que revestiam a decídua capsular, uma degeneração da onfalopleura bilaminar próximo a placenta principal e resquícios da membrana de Reichert justapondo-se ao tecido uterino.

Fischer e Floyd (1972) em seus estudos sobre o desenvolvimento placentário do esquilo da Mongólia, um pequeno roedor da família Muridae, observaram que a partir do vigésimo terceiro dia inicia-se o rompimento da membrana de Reichert, que começa a se contrair, formando uma aglomerado de membranas com várias dobras, enroladas na circunferência do disco placentário, que contem também nesse aglomerado, células endodérmicas parietal. Observaram que desde o momento em que ocorre a degeneração decidual até o momento em que a camada endodérmica do saco vitelino visceral fica em aposição ao lúmen uterino, é caracterizado como uma inversão completa das camadas germinativas do saco vitelino nesta espécie.

Por sua vez, em estudos realizados por Deren, Padykula e Wilson (1966) com coelhos e ratos para observar o desenvolvimento e função do saco vitelino na transferência de vitamina B₁₂, da mãe para o feto, observaram a inversão do saco vitelino e que o rompimento da parede parietal do saco vitelino ocorreu por volta do décimo quinto dia de gestação, no qual expôs a

parede visceral do saco vitelino ao epitélio uterino. De modo que a superfície das células absorptivas da camada visceral do saco vitelino mostra capacidade na absorção de macromoléculas.

Em observações feitas sobre a espécie de ratos saltadores (*Zapodinae*) e do jerboa norte-africano (*Dipodidae*), por King e Mossman (1974) que estudaram as membranas fetais dessas espécies através de técnicas de microscopia eletrônica, conseguiram identificar a inversão completa do saco vitelino nessas espécies, devido ao desaparecimento da sua camada parietal. Além disto, os autores mencionam o desaparecimento tardio desta camada quando comparada as espécies *Hystricomorpha* e *Myomorpha*, entretanto, não é explicado o tempo exato, em dias de gestação em que ocorre essa inversão, por conta dos estudos serem realizados com espécies que foram doadas fixadas. Outro fato que foi evidenciado foi ausência de vilosidades no saco vitelino, já invertido, na espécie dos ratos saltadores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a formação do saco vitelino e da decídua em cutias da espécie *Dasyprocta leporina*, na fase inicial de gestação, bem como identificar receptores de hormônios e de filamentos intermediários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o desenvolvimento do saco vitelino de cutias *Dasyprocta leporina* no terço inicial da gestação;
- Caracterizar as alterações morfológicas que ocorrem no útero e membranas extraembrionárias em função do processo de implantação;
- Verificar a presença de receptores hormonais de estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica (humana) nas células endometriais e deciduais em cutias; e
- Estabelecer a presença de receptores de filamentos intermediários como: vimentina e desmina nas células do endométrio e da decídua em cutias.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, n. 6, p. 603-628, 1993.
- ANVAROVNA, S. P.; ISAKOVICH, A. D.; KHUDOYBERGANOVNA, K. K.; ASKAROVNA, M. N.; MAKSUTALIEVICH, T. K.; RASULOVICH, R. O. Morphofunctional Characteristics of the Parotid Salivary Glands of Rabbits in Postnatal Ontogenesis. **International Journal of Health & Medical Sciences**, p. 22, 2024.
- BULLETTI, C.; BULLETTI, F. M.; SCIORIO, R.; GUIDO, M. Progesterone: The key factor of the beginning of life. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14138, 2022.
- CAMPOS, L. B.; PEIXOTO, G. C.; LIMA, G. L.; CASTELO, T. S.; SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 188-192, 2015.
- CAN, A.; TEKELİOĞLU, M.; BALTACI, A. Expression of desmin and dintin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. **Placenta**, v. 16, n. 3, p. 261-275, 1995.
- CARREIRO, A. N.; DINIZ, J. A. R. A.; SOUZA, J. G.; ARAÚJO, D. V. F.; DIAS, R. F.; AZERÊDO, L. M. S.; ROCHA, E. F.; La SALLES, A. Y. F.; PEÑA-ALFARO, C. E.; CARVALHO, M. A. C.; ILLERA, M. J.; MENEZES, D. J. A. Ovary and vaginal epithelium dynamics during the estrous cycle in *Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831: ultrasound and cytological examinations. **Journal of veterinary science**, v. 19, n. 3, p. 446-451, 2018.
- CARTER, A. M. Animal models of human placentation—a review. **Placenta**, v. 28, p. S41-S47, 2007.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; ODUOR-OKELO, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 35-48, 2004.

COLE, L. A. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 8, 2009.

COLE, L. A.; DUTOIT, S.; HIGGINS, T. N. Total hCG tests. **Clínica Chimica Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2216-2222, 2011.

CONCEIÇÃO, R. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 253-259, 2008.

CORTES, J. N. S. **O impacto da exposição pré-gestacional à poluição atmosférica sobre o processo de implantação embrionária em camundongos**. Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, 2012.

COSTA, M. L.; ESCALEIRA, R.; CATALDO, A.; OLIVEIRA, F.; MERMELSTEIN, C. S. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, p. 1819-1830, 2004.

CROSS, J. C. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 857, n. 1, p. 23-32, 1998.

CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1508-1518, 1994.

D'AVILA, C. A.; MORAES, F. P. D.; JUNIOR, T. L.; GASPERIN, B. G. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos—Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 4, p. 797-802, 2019.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. Hastings. Development of structure and function in the mammalian yolk sac: II. Vitamin B12 uptake by rabbit yolk sacs. **Developmental Biology**, v. 13, n. 3, p. 349-369, 1966.

DINIZ, J. A. R. A.; AZERÊDO, L. M. S.; ROCHA, E. F.; NÓBREGA, A. C.; FALCÃO, B. M. R.; SOUZA, J. G.; CARVALHO, M. A. M.; MENEZES, D. J. A. Características reprodutivas de cutias fêmeas (*Dasyprocta prymnolopha* wagler, 1831) criadas em cativeiro no nordeste do Brasil. **PUBVET**, v. 13, p. 162, 2019.

EMMONS, L.; REID, F. *Dasyprocta leporina*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2016. e.T89497102A22197762.

ENDERS, A. C. Structural responses of the primate endometrium to implantation. **Placenta**, v. 12, n. 4, p. 309-325, 1991.

FAVARO, R; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, M. T. Decidualization and endometrial extracellular matrix remodeling. In: **The guide to investigation of mouse pregnancy**. Academic Press, 2014. p. 125-142.

FISCHER, T. V.; FLOYD, A. D. Placental development in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. From the establishment of the labyrinth to term. **American Journal of Anatomy**, v. 134, n. 3, p. 321-335, 1972.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of toxicologic pathology**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2014.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D; VALE, W. G. Determinação do ciclo reprodutivo da Cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **Acta Amazônica**, v.27, n.1, p.55-64, 1997.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. **The Anatomical Record**, v. 170, n. 4, p. 437-455, 1971.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. **Criação de cutias**. Minas Gerais: Aprenda Fácil, 2001.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. Elsevier Brasil, 2012.

JOLLIE, W. P. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. **Teratology**, v. 41, n. 4, p. 361-381, 1990.

KING, B. F.; MOSSMAN, H. W. The fetal membranes and unusual giant cell placenta of the jerboa (*Jaculus*) and jumping mouse (*Zapus*). **American Journal of Anatomy**, v. 140, n. 3, p. 405-431, 1974.

KORGUN, E. T.; CAYLI, S.; ASAR, M.; DEMIR, R. A. M. A. Z. A. N. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. **Journal of molecular histology**, v. 38, p. 253-260, 2007.

LA PAZ, M. N.; FONSECA, V. U.; CAMPOS, D. B.; ARTONI, L. P.; SOUSA, L. M.; PAPA, P. C. Produção de progesterona in vitro pelas células do corpo lúteo bovino ao longo da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 370-376, 2007.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia – Roedores Selvagens (Capivara, Cutia, Paca e Ouriço). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária** 2.ed. São Paulo: Roca. 2014.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 102, n. 03, p. 122-134, 1994.

LIN, S.; ZHU, Y. Y.; HU, W.; YANG, Y.; LUO, J. M.; HU, S. J.; YANG, Z. M. Decidual expression and regulation of fatty acid desaturase 3 during mouse decidualization. **Reproduction**, v. 156, n. 5, p. 429-437, 2018.

LU, L.; CHEN, Y.; YANG, Z.; LIANG, S.; ZHU, S.; LIANG, X. Expression and Regulation of a Novel Decidual Cells-Derived Estrogen Target during Decidualization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 302, 2022.

MARTINS, B. B.; TEIXEIRA, N. S.; TEIXEIRA, S. A.; GIANNOTTI, J. G.; NUNES, L. C.; FREITAS, P. M.; MACHADO-NEVES, M.; LUZ, M. R. Uterine secretory activity and histology of prepubertal female dogs in an animal model of partial ablation of endometrial glands development. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 134-140, 2020.

MAS, A. E.; PETITBARAT, M.; DUBANCHET, S.; FAY, S.; LEDÉE, N.; CHAOUAT, G. Immune regulation at the interface during early steps of murine implantation: involvement of two new cytokines of the IL-12 family (IL-23 and IL-27) and of TWEAK. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 4, p. 323-338, 2008.

MEDEIROS, S. F. D.; NORMAN, R. J. Formas moleculares da gonadotrofina coriônica humana: características, ensaios e uso clínico. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, p. 251-263, 2006.

MIGLINO, M. A.; CARTER, A. M.; FERRAZ, R. D. S.; MACHADO, M. F. Placentation in the capybara (*Hydrochaerus hydrochaeris*), agouti (*Dasyprocta aguti*) and paca (*Agouti paca*). **Placenta**, v. 23, n. 5, p. 416-428, 2002.

MIGLINO, M. A.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; BONATELLI, M.; MACHADO, M. F.; MESS, A. Development of the inverted visceral yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Placenta**, v. 29, n. 8, p. 748-752, 2008.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate Fetal Membranes: comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities**. London: MacMillan Press, 1987.

MOSSMAN, H. W.; WEISFELDT, L. A. The fetal membranes of a primitive rodent, the thirteen-striped ground squirrel. **American Journal of Anatomy**, v. 64, n. 1, p. 59-109, 1939.

MOURA, S. G.; CARVALHO, M. A. M.; ARAÚJO, W. R.; VIEIRA, R. J.; ALMEIDA, M. M.; OLIVEIRA, M. F. Proposta de classificação para útero da cutia (*Dasyprocta aguti*, Linnaes, 1766). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 284-285, 2003.

OLIVEIRA, G. B. D.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C.; MOURA, C. E. B.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 512-520, 2015.

OLIVEIRA, G. B.; ARAÚJO JÚNIOR, H. N.; SILVA COSTA, H.; SILVA, A. R.; MOURA, C. E. B.; OLIVEIRA ROCHA, H. A.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Animal reproduction science**, v. 182, p. 35-47, 2017.

OLIVEIRA, G. B.; ARAÚJO JÚNIOR, H. N.; SOUSA, R. S.; BEZERRA, F. V. F.; SANTOS, A. C.; MOURA, C. E. B.; SILVA, A. R.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Morphology of the genital organs of the female red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*, Linnaeus, 1758) during estrous cycle phases and in advanced pregnancy. **Journal of morphology**, v. 280, n. 8, p. 1232-1245, 2019.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentina. In: REIS, N. R.; PERACCHI A. L.; PEDRO W. A.; LIMA I. P. (Eds). **Mamíferos do Brasil**. 2.ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 92-95. 2011.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied, 1820**. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres). Universidade de São Paulo. 2004.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). **Placenta**, v. 27, n. 1, p. 87-97, 2006.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBRÓSIO, C. E.; DANTAS, C. A.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 39, 2008.

OLIVEIRA, S. F. D.; GRECA, C. P. S.; ABRAHAMSOHN, P. A.; REIS, M. G.; ZORN, T. M. T. Organization of desmin-containing intermediate filaments during differentiation of mouse decidual cells. **Histochemistry and cell biology**, v. 113, n. 4, p. 319-327, 2000.

ORWIG, K. E.; RASMUSSEN, C. A.; SOARES, M. J. Decidual signals in the establishment of pregnancy: The prolactin family: A review. **Placenta**, v. 18, p. 329-343, 1997.

PAREJA, O. D. S.; URBANETZ, A. A.; URBANETZ, L. A. M. L.; CARVALHO, N. S. D.; PIAZZA, M. J. Características ecográficas do corpo lúteo em gestações iniciais: morfologia e vascularização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 549-555, 2010

PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DEY, S. K. Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholestrogen-mediated embryonic activation. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, p. 840-843, 1997.

PTASZYNSKA, M. **Compêndio de Reprodução Animal** – Intervet. 2010.

RAMOS, J. L. G.; RAMOS, C. L. F. G.; CUNHA, I. C. N.; CARVALHO, E. C. Q.; SHIMODA, E.; LUZ, M. R. Análise histomorfométrica do útero na espécie canina do nascimento aos seis meses de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 41-48, 2015.

ROBERTS, R. M.; GREEN, J. A.; SCHULZ, L. C. The evolution of the placenta. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R179-R189, 2016

RODRIGUES, R. F.; MIGLINO, M. A.; FERRAZ, R. H. D. S.; MORAIS-PINTO, L. D. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, MD): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 133-137, 2003.

SADLER, T. W. **Langman: Embriologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SASAKI, Y.; LADNER, D. G.; COLE, L. A. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 6, p. 1781-1786, 2008.

SETTI, A. S.; FIGUEIRA, R. C. S.; BRAGA, D. P. D. A. F.; IACONELLI JR, A.; BORGES JR, E. Blastomere nucleation: Predictive factors and influence of blastomere with no apparent nuclei on blastocyst development and implantation. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 22, n. 2, p. 102, 2018.

SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 51, 2004.

SOARES, M. L.; TORRES-PADILLA, M. E.; ZERNICKA-GOETZ, M. Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates development of the anterior visceral endoderm in the mouse embryo. **Development, growth differentiation**, v. 50, n. 7, p. 615-621, 2008.

TAO, J.; TAMIS, R.; FINK, K.; WILLIAMS, B.; NELSON-WHITE, T.; CRAIG, R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. **Human reproduction**, v. 17, n. 6, p. 1513-1518, 2002.

VALE, A. M.; OLIVEIRA, G. B.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A.; PAULA, V. V.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F. Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1033-1040, 2013.

ZHAO, M; ZHANG, W; LIU, J. A study on regional differences in decidualization of the mouse uterus. **Reproduction**, v. 153, n. 5, p. 645-653, 2017.

CAPÍTULO II

RED-RUMPED AGOUTI (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) YOLK SAC DEVELOPMENT DURING THE EARLY GESTATION STAGE

Artigo submetido a revista Zoomorphology, ISSN 1432-234X. Qualis A3.

RED-RUMPED AGOUTI (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) YOLK SAC DEVELOPMENT DURING THE EARLY GESTATION STAGE

João Augusto Rodrigues Alves Diniz¹, Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa¹, Igor Renno Guimarães Lopes¹, Carlos Eduardo Bezerra de Moura¹, Danilo José Ayres de Menezes², Phelipe Oliveira Favaron³, Alexsandra Fernandes Pereira¹, Moacir Franco de Oliveira¹

1 Department of Animal Sciences, Postgraduate Program in Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte, Mossoró, Brazil

2 Department of Morphology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

3 Department of General Biology, Biological Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author: joao-diniz15@hotmail.com

João Augusto Rodrigues Alves Diniz (<https://orcid.org/0000-0001-5329-9059>), Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa (<http://orcid.org/0000-0001-5883-9704>), Igor Renno Guimarães Lopes (<https://orcid.org/0000-0003-1832-4647>), Carlos Eduardo Bezerra de Moura (<https://orcid.org/0000-0002-7960-5373>), Danilo José Ayres de Menezes (<https://orcid.org/0000-0001-6089-3283>), Phelipe Oliveira Favaron (<https://orcid.org/0000-0002-6431-6886>), Alexsandra Fernandes Pereira (<https://orcid.org/0000-0003-2137-854X>), Moacir Franco de Oliveira (<http://orcid.org/0000-0002-6269-0823>)

Abstract

Phylogenetically, the yolk sac is an ancient structure in vertebrate evolution and crucial in the placentation of viviparous animals, playing an essential role in embryogenesis. Considering that the yolk sac persists until birth in rodents, forming an active placenta, this study aimed to describe the yolk sac development process in red-rumped agoutis (*Dasyprocta leporina*) during the early gestation phase and associating the progression to morphological changes in other structures. To this end, six female red-rumped agoutis obtained from CEMAS-UFERSA were monitored for 24 h. The first gestation day was defined as 24 h post-copulation. Samplings were carried out on the 13th, 14th and 15th pregnancy days. Pregnant uteri were fixed in 8% paraformaldehyde for 72 h and histologically processed, with 5 µm sections stained with

Hematoxylin-Eosin (HE) and analyzed under a light microscope. On the 13th day, the blastocyst is implanted on the antimesometrial side of the uterus, surrounded by uterine stromal cells organizing themselves around this structure. On the 14th day, the intramural wall between the uterus and the embryo begins to break down and the parietal yolk sac exhibits spindle cells, while the visceral yolk sac presents eosinophilic cuboidal cells. On the 15th day, the intramural layer is almost completely ruptured, revealing a vascular bed between the embryo and the decidua. The visceral yolk sac did not yet contain its characteristic villi at this stage. This study contributes significantly to the understanding of yolk sac development in rodents, highlighting its role in embryonic development and placental formation in caviomorphs.

Keywords: Extraembryonic membranes · morphology · placentation · rodents

Introduction

Fetal membranes arose during the evolutionary vertebrate process to guarantee the embryonic life of different species, whether in aquatic or terrestrial environments or within female reproductive systems. In fish, reptiles and birds, the yolk sac contains nutritional reserves, guaranteeing embryo nutrition (Stewart and Florian JR 2000; Shibata, Makihara and Iwasawa 2023), although some fishes, amphibians and reptiles have developed a type of placentation that assumes this function at a certain embryonic development stage (Stewart 1993; Leiser and Kaufmann 1994). In mammals, this membrane is mainly associated with maternal-fetal exchanges, although it assumes very similar functions to those observed in reptiles and birds in monotremes (Hughes 1993).

In the phylogenetic context of extraembryonic membranes, the yolk sac emerges as one of the oldest vertebrate structures, playing a fundamental role throughout embryogenesis (Ross and Boroviak 2020). For decades embryological yolk sac assessments remained scarce, despite its known importance in embryonic development and the fact that any changes during its development may lead to etiological or pathogenic processes in many congenital malformations (Ornoy and Miller 2023).

In rodents, the yolk sac's primary function is to nourish the embryo until it has developed enough to maintain itself and is the only maternal-fetal exchange route in initial development phases. In this group, the yolk sac undergoes an inversion process in relation to the main placenta at a specific gestation phase, in some cases place prior to the embryonic development stage (Jollie 1990), or during initial phases, as observed for cavies (*Galea spixii*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) (Oliveira et al. 2012). This inversion occurs in most rodents,

with the visceral portion of the yolk sac located over to the fetal side of the chorioallantoic placenta and the parietal portion juxtaposed over the placenta (Oliveira et al. 2006; Conceição et al. 2008; Miglino et al. 2008).

Embryonic attachments such as the yolk sac have been considered of secondary importance during the gestation period (Shibata, Makihara and Iwasawa 2023), even in caviomorph rodents. This structure, however, is evolutionarily significant, as it remains a functionally active membrane until the end of gestation in rodents (Jollie 1984; Mossman 1987; Ornoy and Miller, 2023). This led us to investigate the formation of this attachment in red-rumped agoutis (*Dasyprocta leporina*) during the initial gestation phase, associated with morphological changes in other structures, aiming to establish evolutionary correlations with other species.

Material and methods

Samples were obtained from the Wild Animal Multiplication Center belonging to the Federal Rural University of the Semiarid (CEMAS/UFERSA), in Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, registered by IBAMA as a scientific breeding site (n° 1478912). Sample processing was carried out at the Applied Animal Morphophysiology Laboratory (UFERSA).

This study was submitted and approved by the Ministry of the Environment, through the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) n° 77483-1, of the Chico Mendes Institute (ICMBio) and the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFERSA) n° 09/2021.

Six non-pregnant nulliparous red-rumped agoutis females of reproductive age were used. The animals were maintained in screened 5x5 m² boxes with a cemented floor at a 2:1 female/male ratio, respectively. The animals were fed commercial pelleted feed (minimum crude protein-12%, etheric extract-1.5%, fibrous matter-12%, mineral matter-13%, calcium-1.3% and phosphorus-0.4%), corn, seasonal regional fruits and vegetables and allowed water, all *ad libitum*. Following group formation, females were marked with hair dye (Embelleze Maxton - Cherry Red 6.66) for differentiation.

The animals were monitored 24 h a day by cameras to note the exact copulation moment. The first day of gestation was established as 24 h from the copulation moment, and samples were collected on the 13th, 14th and 15th gestation days.

To sample the fetal attachment structures, animals were administered a pre-anesthetic intramuscular medication combining ketamine (12 mg.kg⁻¹) and xylazine (2 mg.kg⁻¹), followed by anesthetic induction with propofol (8 mg.kg⁻¹) via the cephalic vein. After anesthetic

confirmation, the animals were euthanized by injecting potassium chloride solution (1 ml.kg^{-1}) through the same venous access, with death confirmed when no heartbeat was detected.

The animals were placed in dorsal decubitus and an incision was made in the pre-umbilical direction immediately after local asepsis with 70% alcohol, exposing the pregnant uterus, which was then sectioned at the probable embryo location (implantation site). The uterine fragment where the embryo was located was then fixed in an 8% paraformaldehyde solution buffered with 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4 for 72 h.

The samples were histologically processed (Tolosa et al., 2003), initially dehydrated in an increasing alcohol series (70%, 80%, 90%, 95%, absolute I, absolute II, absolute III) for 1 h each, followed by clearing in two xylol baths for 45 min each. They were then immersed in two histological paraffin baths set at 58°C in an oven, one for 12 h and the other for 1 h. Finally, histological blocks were prepared and $5 \mu\text{m}$ thick sections were obtained with the aid of a Leica RM2125 RT® microtome. The samples were then adhered to histological slides, subsequently dewaxed in an oven at 58°C , stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and analyzed under an Olympus CX 31 RBSFA light microscope. Images were captured using a LEICA ICC50W camera and analyzed using the LAS EZ Ink program.

Results

The blastocyst is implanted on the antimesometrial side of the uterus on the 13th days of gestation, surrounded by uterine stromal cells completely that enclose the embryo (Figure 1A). A thin layer of spindle cells and an intramural membrane (Figures 1D) containing blood and forming a barrier between the uterus and the blastocyst, is noted around the blastocyst (Figure 1C).

The fetal membranes have not yet differentiated at this stage and are, therefore, not present in the histological sections. A septate subplacenta, however, is noted the mesometrial side of the blastocyst (Figure 1A), containing secretory content that extravasates between endometrial cells. Giant trophoblastic cells and syncytiotrophoblast-type cells are also observed in the subplacenta.

On the 13th gestation day, a layer of cubic trophoblastic cells with a basal nucleus and eosinophilic cytoplasm is observed in the blastocyst, lining the blastocystic cavity, called the blastocoele. These cells are both yolk sac and chorion precursors. The internal cell mass (ICM)

begins to form at one of the poles, towards the antimesometrial direction, forming a bilaminar cell layer that will differentiate into hypoblast and epiblast cells (Figures 1C and D).

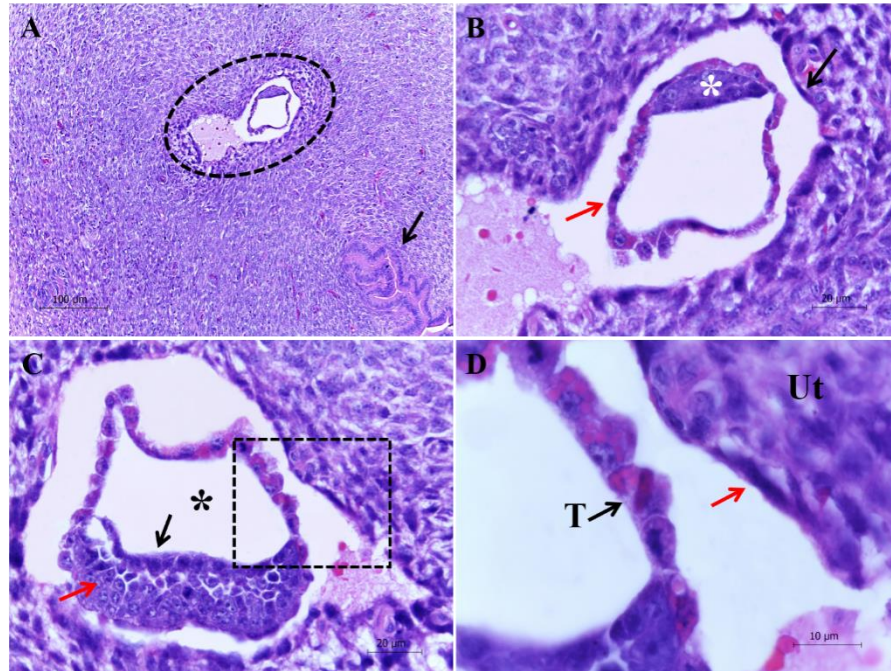


Figure 1. (A) Embryo (circle) of a red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) implanted in the uterus, 13th gestation day. The embryo is located in an antimesometrial position and one of its poles contains an immature subplacenta (arrow); (B) Note: Intramural membrane (black arrow), inner cell mass (asterisk) and trophoderm cells (red arrow). Cells are distributed around the intramural membrane, forming a barrier limited by the intramural membrane; (C) Beginning of the bilaminar embryo differentiation process through the hypoblast (black arrow) and epiblast (red arrow) layers. Note the blastocoele (asterisk); (D) Indicates the distance between uterine cells (Ut) and trophoblastic cells (T) (also highlighted in image C by the square), which are limited by a thin layer of intramural membrane squamous cells (red arrow). Staining: HE. Bars: 100 μ m, 20 μ m, 20 μ m and 10 μ m, respectively.

A well-structured blastocyst arrangement implanted in the uterus is observed from the 14th day of gestation onwards (Figures 2A and B). An immature main placenta with the presence of blood lacunae and the approximation of the subplacenta in the placental cone are noted. Giant trophoblastic cells, cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts can be identified in this area (Figures 2C and D).

At this stage, the yolk sac already exhibits its characteristic morphology, with parietal and visceral layers composed of fusiform squamous cells (Figures 2B and C). Trophoderm layer

cells remain cubic, covering the parietal yolk sac, giving the appearance of a bilaminar layer (Figure 2C).

During this gestation phase, the hypoblast and epiblast cells begin to distinguish themselves and form the amniotic cavity, located between embryoblast cells. The inner cell mass is well delineated with cells exhibiting a small spacing with the mural trophectoderm, which is differentiated by its rounded cellular appearance and an eosinophilic cytoplasm (Figure 2B). On the 14th day of gestation, the intramural membrane that separates the uterine cells from the embryo proper begins to degrade, allowing the embryo to contact maternal blood cells. Although this degradation is noted, it is still possible to observe maternal blood gaps forming around the embryo (Figure 2AB).

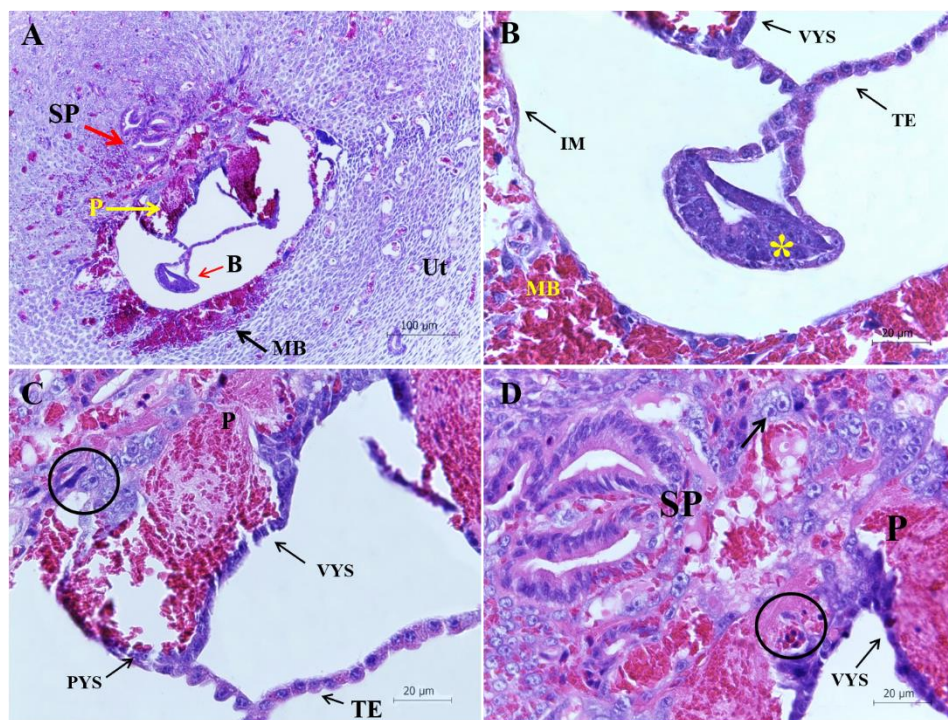


Figure 2. (A) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) embryo on the 14th gestation day. The following are observed: the subplacenta (SP – red arrow) close to the main placenta (P – yellow arrow), the blastocyst (B) at the beginning of its differentiation process and the presence of extravasated maternal blood (MB) around the implantation site. Note the presence of a tenuous membrane delimiting the entire surroundings of this region (intramural membrane); (B) Layer of cubic trophectoderm (TE) cells surrounding the blastocyst (asterisk). Formation of the visceral yolk sac (VYS) and separation of the maternal blood (MB) from the embryo through the intramural membrane (IM); (C) Differentiation of the visceral (VYS) and parietal yolk sac (PYS) and trophectoderm layer (TE) on the parietal layer of the yolk sac and the presence of the main placenta (P) in its initial development phase containing giant trophoblastic cells (circle); (D) Approximation of the subplacenta (SP). The syncytiotrophoblast is arranged in the form of cords that

return towards the main placenta (P). Note: cells of a cytotrophoblastic nature (circle) and giant trophoblastic cells (arrow). Color: HE. Bars: 100 μm , 20 μm , 20 μm and 20 μm , respectively.

The yolk sac inversion process begins on the 14th gestation day, explained by the beginning of the rupture of the intramural membrane that separates the uterus from the embryo, since this membrane is still intact on the 13th day, forming a barrier. The parietal and visceral yolk sac layers are well delimited from each other at this stage (Figures 2B and C), with parietal yolk sac cells remaining fusiform, becoming cubic in some regions, unlike visceral yolk sac cells, which remain fusiform.

On the 15th gestation day, the embryo comprises an elongated structure surrounded by an blood-filled area. The mural trophoblast cells contain vacuoles, giving them the appearance of hair cells. Their cytoplasm is abundant and quite eosinophilic, with a tenuous connecting membrane between cells. When viewed under light microscopy, their nuclei appear to be arranged in a basal position (Figures 3A and B). The ICM is noted at one of the poles, beginning the bilaminar embryonic disc differentiation process, which is composed of hypoblast and epiblast cells. The amniotic cavity will form from this differentiation, providing fetal protection. Given the embryo elongation process, a very spacious exocoelomic cavity is observed (Figure 3B).

The yolk sac is well differentiated, and its parietal and visceral membranes are composed of fusiform cell groups arranged longitudinally, forming a simple squamous epithelium (Figures 3C and D). Areas represented by blood sites are identified along the length of this structure, which represent initial exchange mother-fetus structures, considering the close relationship between fetal structures and uterine tissue. At this stage, although still disorganized, some of the placenta's labyrinthine characteristic are also distinguished by the presence of scattered syncytiotrophoblastic and cytotrophoblastic cells forming its parenchyma (Figure 3C).

Decidual cells are rounded, with large nuclei containing condensed chromatin surrounding the embryo. The nucleus of the cells that move away from the decidua are more organized and the closer to the muscular layer of the uterus, the more integral cells are observed, certainly due to the fact that they are not affected by the blastocyst invasion (Figure 3D).

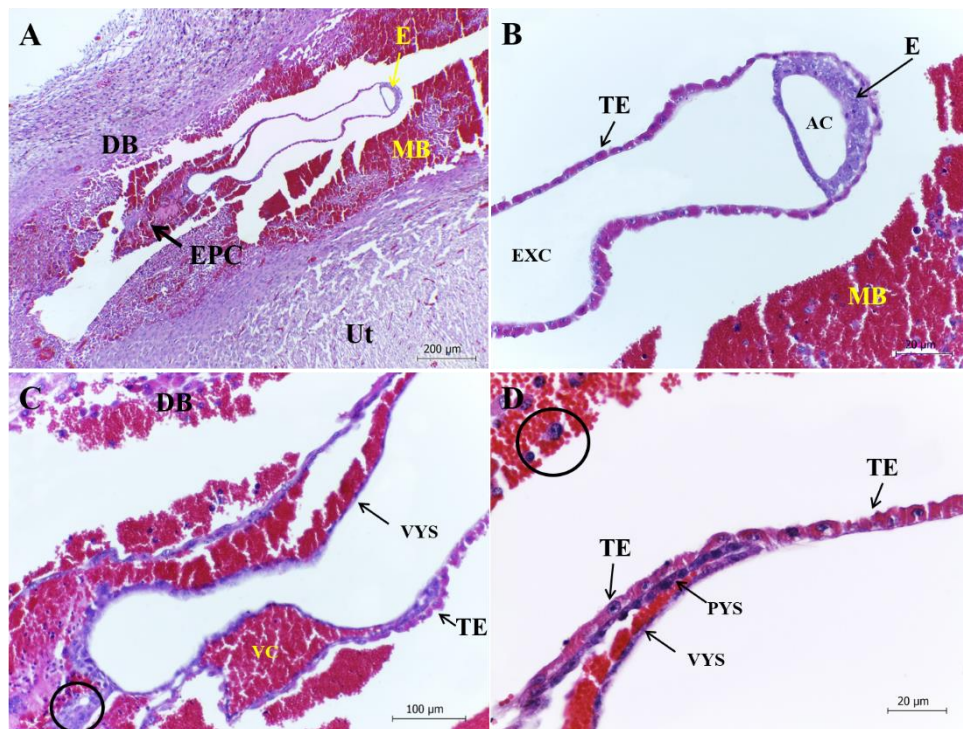


Figure 3. (A) Red-rumped agouti embryo (*Dasyprocta leporina*) implanted at 15 days of gestation. The ectoplacental cone (EPC) is located at one of the poles and the embryo (E), on the opposite pole. A large area filled with maternal blood (MB) and the presence of an extensive area composed of cells making up the decidua basalis (DB) and its relationship with the uterus (Ut) are noted around the (EPC); (B) The embryonic pole containing the embryo (E) with the amniotic cavity already present (AC) and the exocoelomic cavity (EXC) formed by the trophoblast (TE) can be seen towards the ectoplacental cone. MB = maternal blood); (C) Formation of the vitelline cavity (CV) composed of the visceral yolk sac (SVV) and parietal and chorionic cells proper or the trophoblast (circle) differentiating to give rise to the placenta. TE = trophoblast. (D) Trophoblast cells (TE) superimposed on the parietal yolk sac (PYS), next to the visceral yolk sac (VYS), giving an appearance of a trilaminar layer, in addition to the presence of decidua capsularis cells (circle) between maternal blood cells. HE staining.

The yolk sac becomes inverted on the 15th gestation day since the intramural membrane is practically ruptured, and a large vascular bed between the embryo and the decidua is observed, leading to contact between uterine cells and the yolk sac. On the 15th gestation day, the yolk sac still does not present the characteristic villi of more advanced gestation ages.

Discussion

The morphological aspects related to fetal membranes and the placenta undergo variations throughout the gestation of various animal species, although extraembryonic structures, such as the visceral yolk sac, the amnion and the placenta, persist until the end of gestation in rodents (Cross 1998).

In eutherian animals, embryo formation is characterized by the grouping of spherical cells composed of a unicellular layer of trophoblastic cells that give rise to a cavity filled with liquid

and a cluster of internal cells, as observed on the 13th gestation day for red-rumped agouti. These trophoblastic cells can be distinguished into those under the inner cell mass, the polar trophoblast, and those that form the sphere, the mural trophoblast (Pfeffer 2022). This configuration, according to this Pfeffer (2022), is specific to eutherian animals, unlike other mammals such as marsupials and monotremes, which may represent different development strategies adopted by certain species.

Although the yolk sac is not present during the red-rumped agouti pregnancy on the 13th gestation day, a thin layer of hypoblastic cells begins to detach from the ICM. Such movement is a signal for the formation of the yolk sac and its extraembryonic constituents, which represents a eutherian mammal characteristic, as the yolk sac cells are derived from hypoblast-originated cells (Frankenberg et al. 2016; Mess 2014).

In rodents, the yolk sac in its first cellular conformation, still in the blastocyst, is considered a bilaminar structure, composed of trophoblastic cells and a single layer of endodermal cells, corresponding to the hypoblast (Ross and Boroviak 2020). This cell layer then proliferates from the ICM layer at the embryonic pole, but later becomes a trilaminar structure, composed of endodermal, mesodermal and ectodermal membranes (Mossman 1987). This structure has the primary function of nourishing the embryo until it is well developed and can nourish itself (Jollie 1990). Structures such as the amnion and allantois, as well as yolk sac elements, also originate from the ICM (Carter and Enders 2004).

On the 15th gestation day, the red-rumped agouti yolk sac is represented by a structure with a trilaminar appearance, composed of its parietal and visceral walls, as well as a portion of the trophoctoderm that partly covers the parietal wall. The cellular configuration of these layers plays an essential role in the evolution and formation of the future chorioallantoic placenta and yolk sac, with crucial implications for the development of their functions (Ornoy and Miller 2023).

The bilaminar layer observed in the embryo on the 14th gestation day, which comprises the parietal layer of the yolk sac with that of the trophoctoderm, also called bilaminar omphalopleura, is not yet classified as a true placenta. This can only be considered when an interposition of the parietal layer between the visceral layer of the yolk sac and the trophoctoderm is present, allowing for yolk sac vessel branches to come closer to form the trilaminar omphalopleura, which will serve as a choriovitelline placenta (Carter and Enders 2004).

Rodents such as the cavy (*Galea spixii*), that present the same evolutionary characteristics of yolk sac persistence until the end of gestation period, present the same

trilaminar structure conformation of yolk sac layer origin and trophoectoderm origin from the ectoplacental cone and the hypoblast (Oliveira et al. 2012).

The cellular layer of the parietal yolk sac of rodents consists of cells presenting oval nuclei with flat contours and prominent nucleoli, in addition to being connected to Reichert's membrane, forming a discontinuous cell lining throughout the yolk sac cavity. Visceral yolk sac cells are columnar, with the nucleus arranged in a basal position and irregularly shaped, with the nucleolus moderately extended. The apical region of these cells is directed towards the yolk sac cavity and is characterized by numerous microvilli (Haar and Acherman 1971; Oliveira et al. 2006).

During the investigated red-rumped agouti gestational period, the yolk sac did not exhibit the classic columnar cells with numerous villi present in other rodents, such as mouse (Haar and Acherman 1971), cavies (*Galea spixii*) (Vale et al. 2013), rock cavies (*Kerodon rupestris*) (Oliveira et al. 2006) and guinea pigs (Oliveira et al., 2012), explained by an early gestation phase. This is in line with the description reported by Carter and Enders (2004) when referring to yolk sac development in rodents, who indicate that this structure is initially represented by a bilaminar cell layer, becoming trilaminar throughout the gestation period.

It is important to highlight that several studies concerning the placenta and yolk sac in rodent species have been conducted with longer gestation periods (Vale et al. 2013; Oliveira et al. 2006; Oliveira et al. 2012; Conceição et al. 2008; Miglino et al. 2008), but studies for the early gestation phases concerning agouti, a hystricomorph rodent, were still lacking until now. Furthermore, it is paramount to note that the visceral yolk sac is still very incipient in this stage in red-rumped agoutis. Thus, the ontogenesis evolution has not yet been effectively consolidated, as the sac's visceral vitelline is an especially important organ in rodents, representing the main maternal-fetal exchange source in early organogenesis stages, especially in the period preceding the establishment of the chorioallantoic placenta circulation of the (Beckman et al. 1990).

Although it is considered of secondary importance and not very scientifically appreciated, the initial yolk sac phase should not be considered a temporary organ until definitive placenta formation, but rather of significant value in organogenesis and for the development of other membranes, vital for mammals throughout the evolutionary process (Kuzmina 2023; Shibata, Makihara and Iwasawa 2023). Furthermore, the yolk sac is also significant for hystricomorphs, due to its functional persistence until the end of the gestation period.

Conclusion

Knowledge on yolk sac formation in initial pregnancy stages is vital in understanding the embryonic development and placental formation of caviomorphs. This is especially true with regard to the embryonic development of the red-rumped agouti, highlighting the importance of this structure for its reproductive success. This process had not been described until now for this species, which makes this a novel contribution concerning the yolk inversion of this species, which take place between 14 and 15 days of gestation.

Acknowledgements The authors would like to thank the Federal Rural University of Semi-Árido (UFERSA), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 25/2021), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financial Code 001).

Author contributions Contributions of the authors. Mr. J.A.R.A. DINIZ conducted the fundamental research, from data collection to writing. Mrs. A.C.F.C. SOUSA and Mr. I.R.G. LOPES for their contribution to data collection. Dr. C.E.B. MOURA and Dr. D.J.A. MENEZES for their contribution to data analysis or interpretation. Dr. P.O. FAVARON and Dr. A.F. PEREIRA for content review. Dr. M.F. OLIVEIRA Writing and manuscript revision.

Data availability All data used in this study are available upon personal request to the authors.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no potential conflicts of interest concerning the research, authorship and publication of this article.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Authors declare that they know the content of this manuscript and agreed to submit it to Zoomorphology.

References

Beckman DA, Koszalka TR, Jensen M, Brent RL (1990) Experimental manipulation of the rodent visceral yolk sac. *Teratology* 41(4):395-404. <https://doi.org/10.1002/tera.1420410405>

Carter AM, Enders AC (2004) Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(1):1-15. doi:10.1186/1477-7827-2-46

Carter AM, Enders AC (2016) Placentation in mammals: Definitive placenta, yolksac, and paraplacenta. *Theriogenology* 86(1):278-287. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.041>

Conceição RA, Ambrósio CE, Martins DS, Carvalho AF, Francioli ALR, Machado MRF, Oliveira MF, Miglino MA (2008) Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(5): 253-259. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000500005>

Cross JC (1998) Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 857(1):23-32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10104.x>

Frankenberg SR, Barros FR, Rossant J, Renfree MB (2016) The mammalian blastocyst. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 5(2):210-232. <https://doi.org/10.1002/wdev.220>

Haar JL, Ackerman GA (1971) Ultrastructural changes in mouse yolksac associated with the initiation of vitelline circulation. *The Anatomical Record* 170(4):437-455. <https://doi.org/10.1002/ar.1091700406>

Hughes RL (1993) Monotreme development with particular reference to the extraembryonic membranes. *The Journal of experimental zoology* 266(6):480-494. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660602>

Jollie WP (1984) Changes in the fine structure of rat visceral yolk-sac placenta during prolonged pregnancy. *American journal of anatomy* 171(1):1-14. <https://doi.org/10.1002/aja.1001710102>

Jollie WP (1990) Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 41(4):361-381. DOI: 10.1002/tera.1420410403

Kuzmina IV (2023) The yolk sac as the main organ in the early stages of animal embryonic development. *Frontiers in Physiology* 14:1185286. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1185286>

Leiser R, Kaufmann P (1994) Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 102(03): 122-134. DOI: 10.1055/s-0029-1211275

Mess A (2014) Placental evolution within the supraordinal clades of eutheria with the perspective of alternative animal models for human placentation. *Advances in Biology* 2014:1-21. <https://doi.org/10.1155/2014/639274>

Miglino MA, Franciolli ALR, Oliveira MF, Ambrósio CE, Bonatelli M, Machado M F, Mess A (2008) Development of the inverted visceral yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Placenta* 29(8):748-752. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.05.007>

Mossman HW (1987) *Vertebrate Fetal Membranes: comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities*. MacMillan Press, London

Oliveira MF, Vale AM, Favaron PO, Vasconcelos BG, Oliveira GB, Miglino MA, Mess, A (2012) Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). *Placenta* 33(10):878-881. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.06.019>

Oliveira MF, Carter AM, Bonatelli M, Ambrosio CE, Miglino MA (2006) Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). *Placenta* 27(1):87-97. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.11.012>

Ornoy A, Miller RK (2023) Yolk sac development, function and role in rodent pregnancy. *Birth Defects Research* 115(14):1243-1254. <https://doi.org/10.1002/bdr2.2172>

Pfeffer PL (2022) Alternative mammalian strategies leading towards gastrulation: losing polar trophoblast (Raubers' layer) or gaining an epiblast cavity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 377(1865):20210254. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0254>

Ross C, Boroviak TE (2020) Origin and function of the yolk sac in primate embryogenesis. *Nature communications* 11(1): 3760. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17575-w>

Stewart JR (1993) Yolk sac placentation in reptiles: structural innovation in a fundamental vertebrate fetal nutritional system. *Journal of Experimental Zoology* 266 (5):431-449. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660509>

Stewart JR, Florian JR, JD (2000) Ontogeny of the extraembryonic membranes of the oviparous lizard, *Eumeces fasciatus* (Squamata: Scincidae). *Journal of Morphology*, 244(2):81-107. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(200005\)244:2<81::AID-JMOR1>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(200005)244:2<81::AID-JMOR1>3.0.CO;2-D)

Shibata, M.; Makihara, N.; Iwasawa, A (2023) The Yolk Sac's Essential Role in Embryonic Development. *Reviews in Agricultural Science* (11):243-258. https://doi.org/10.7831/ras.11.0_243

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGDF (2003) *Manual de técnicas para histologia: normal e patológica*. 2. ed. Editora Manole, Barueri, São Paulo

Vale AM, Oliveira GB, Favaron PO, Miglino MA, Paula VV, Silva AR, Oliveira MF (2013) Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(8):1033-1040. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000800014>

CAPÍTULO III

EARLY GESTATION PHASE RED-RUMPED AGOUTI (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) DECIDUA CHARACTERIZATION

Artigo submetido a revista Journal of Agricultural Science, ISSN 1469-5146. Qualis

A1.

EARLY GESTATION PHASE RED-RUMPED AGOUTI (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) DECIDUA CHARACTERIZATION

J. A. R. A. Diniz¹, I. R. G. Lopes¹, A. C. F. C. Sousa¹, P. O. Favaron², E. K. F. Lima³, A. R. Silva¹, J. M. A. P. Antunes¹ and M. F. Oliveira¹

¹ Department of Animal Sciences, Postgraduate Program in Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, Rio Grande do Norte, 59.625-900, Brazil; ² Department of General Biology, Biological Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, 86.057-970, Brazil; ³ Department of Health Sciences, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, Rio Grande do Norte, 59.625-900, Brazil.

Corresponding author: J. A. R. A. Diniz, Email: jaradiniz91@gmail.com

Abstract

During early gestation, the uterine epithelium undergoes cellular changes to ensure successful implantation. Thus, the aim was to assess the expression of ovarian hormone markers and intermediate filaments in the decidual region of agoutis (*Dasyprocta leporina*) during early gestation. To do this, three females from CEMAS-UFERSA were monitored, and after copulation, the first day of gestation was defined as 24 hours post-copulation. Collections were made at 15 days of gestation, and gravid uteri were fixed in 8% paraformaldehyde for 72 hours. After histological processing, 5 µm sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and subjected to Periodic Acid-Schiff (P.A.S) reaction and immunohistochemistry, and subsequently analyzed under a light microscope. At 15 days of gestation, the implanted blastocyst was observed in the antimesometrial position in the uterus, surrounded by decidual cells characterized by increased cytoplasmic volume. In the decidual region, cells showed positivity in staining with P.A.S. Regarding staining with desmin and vimentin antibodies, it was found that in the decidual region, cellular cytoplasm stained more intensely for both antibodies. In cells of the decidual region, progesterone marked more intensely, while for estrogen, marking was more intense in cells of the pre-decidual region. The identification of cytoskeletal and hormonal markers in the early stage of gestation in agoutis indicates that cellular modifications in the uterine endometrium in this phase occur rapidly and harmoniously

to ensure successful embryo implantation in the uterus.

Keywords: Decidualization; Immunostaining; intermediate filaments; rodents.

Introduction

The uterus undergoes alterations during the embryo pre-implantation period to ensure adequate embryo survival conditions. This period is associated to the presence of hormones such as estrogen and progesterone, both of which are produced in the ovary during the estrous cycle phase (Cross et al. 1994; Reese et al. 2008; Zhang et al. 2023).

Uterine epithelium cells suffer alterations during the initial pregnancy phase and are termed decidual cells after differentiation. Stimulated by hormones such as progesterone and estrogen, this decidual tissue aids in the embryo implantation process and then surrounds the entire embryo, forming the decidua basalis, in mesometrial position, and the decidua capsularis, in antimesometrial position (Orwig et al. 1997; Soares, 2004).

Progesterone acts by stimulating endometrium changes, reducing the contraction activity of the uterine wall, thus allowing for embryo uterine implantation (Lee et al. 2007; Reese et al., 2008, Ptaszynska, 2010). Estrogen, in turn, activates the blastocyst through the release of catecholesterol-type metabolites during the pre-implantation process, favoring embryo approximation to the endometrium, thus facilitating uterine epithelium trophoblastic invasion (Paria et al. 1997).

In addition to hormonal features associated to morphological uterine epithelium changes, other factors also play a role in ensuring a successful pre-implantation process, such as proteins, cytokines and glycosaminoglycan polymers (Mas et al. 2008; Soares et al. 2008; Oliveira et al., 2015).

Reproductive hormones act on uterine cells, resulting in their ultrastructural readjustment. These modifications affect cell shapes and nuclei, leading to more rounded cells and decreased extracellular space, as well as the synthesis of macromolecules and the accumulation of glycogen and lipids and intermediate filaments (Abrahamsohn e Zorn, 1993). Vimentin stands out as the main filament, derived from embryonic mesoderm cells, and desmin is noteworthy in muscle cells (Korgun et al. 2007). These intermediate filaments are relevant during the decidualization process, as they are part of the uterine stromal cell remodeling process into decidual cells that takes place during cell differentiation (Favaro et al. 2014).

Decidualization is a crucial mammal pregnancy process, including in rodents, in which endometrial cells undergo differentiation to form decidual tissue, which is crucial for pregnancy establishment and maintenance (Abrahamsohn e Zorn, 1993; Ramathal et al. 2010). Hormonal

and intermediate filament staining in rodent uterine cells provide a comprehensive and integrated approach to investigate early decidualization, providing important data useful in understanding reproductive biology aspects. In this context, this study aimed to verify the expression of ovarian hormone markers and intermediate filaments in the decidual region of red-rumped agoutis (*Dasyprocta leporina*) during the initial pregnancy phase.

Materials and methods

Subject and treatments

Sampling was conducted at the Wild Animal Multiplication Center (CEMAS) belonging to the Federal Rural University of the Semiarid (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, registered by IBAMA as a scientific breeding site (n° 1478912). Sample processing procedures were carried out at the Applied Animal Morphophysiology Laboratory (UFERSA). The study was approved by the Ministry of the Environment, through the Chico Mendes Institute (ICMBio) Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) (no. 77483-1), and the UFERSA Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFERSA n° 09/2021).

Three non-pregnant nulliparous female red-rumped agoutis of reproductive age were employed. The animals were maintained in screened 5x5 m² boxes with a cemented floor at a 2:1 female/male ratio. The animals were fed commercial pelleted feed (minimum crude protein-12%, etheric Extract-1.5%, fibrous matter-12%, mineral matter-13%, calcium-1.3% and phosphorus-0.4%), corn, seasonal regional fruits and vegetables and water *ad libitum*. Following group formation, females were marked with hair dye (Embeleze Maxton - Cherry Red 6.66) to differentiate each other.

The animals were monitored 24 h a day by cameras to determine the exact copulation moment. The 1st gestation day was established 24 h after copulation, and samples were collected on the 15th gestation day.

For uteri sampling, the animals were intramuscularly pre-anesthetized with a combination of ketamine (12 mg.kg⁻¹) and xylazine (2 mg.kg⁻¹), followed by anesthetic induction by the administration of propofol (8 mg.kg⁻¹) via the cephalic vein. They were then euthanized with a potassium chloride solution (1 ml.kg⁻¹) injected through the same venous propofol access. Death was confirmed by the absence of a heartbeat.

The animals were then placed in dorsal decubitus and an incision was made immediately following local asepsis with 70% alcohol in the pre-retroumbilical direction to guarantee pregnant uterus exposure. The uteri were sectioned at the probable embryo implantation site

and tissues fragments were fixed in an 8% paraformaldehyde solution buffered with 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4 for 72 h, followed by sample processing for microscopic analyses according to Tolosa et al. (2003). Briefly, samples were dehydrated in an increasing ethanol series (70%, 80%, 90%, 95%, absolute I, absolute II, absolute III) for 1 h each, followed by clearing in two xylene baths for 45 min each. The samples were then immersed in two histological paraffin baths at 58°C in an oven, for 12 h and 1 h, respectively. Histological blocks were prepared, with 5 µm sample sections obtained with the aid of a LEICA RM2125 RT® microtome and adhered to histological slides. The prepared slides were then dewaxed in an oven at 58°C, stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Periodic Acid-Schiff (PAS) (TOLOSA et al., 2003) and analyzed under an Olympus CX 31 RBSFA light microscope. Images were captured under a LEICA DM 500 HD light microscope coupled to a LEICA ICC50W camera employing the LAS EZ Ink program.

Imunohistochemistry (IHC) analyses

The histological sections adhered to silanized slides were deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing ethanol concentrations (100%, 100% 90%, 80% and 70%) and washed with distilled water. Antigens were retrieved by washing with 0.05% Tween prepared in PBS for 60 min, followed by two PBS washes. A 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) solution was to block endogenous peroxidase and non-specific reactions for 30 min in a dark chamber protected from light and the samples were washed twice in PBS for 5 min each following by another wash with 1% BSA (albumin) prepared in PBS for 60 min. Prior to incubation, the slides were washed in PBS, dried and incubated with the primary antibodies (Table 1) diluted in PBS at 4°C for 20 h (overnight) in a dark, humid chamber.

H&L rabbit anti-mouse IgG (HRP) was used as the secondary antibody (ab6728 abcam, Cambridge, UK) for the investigated hormonal markers (progesterone, 1:100, estrogen, 1:25 and hCG , 1:100), while H&L goat anti-rabbit IgG (HRP) (Ab205718 abcam, Cambridge, United Kingdom; 1: 100) and H&L goat anti-mouse IgG (HRP) (Ab205719 abcam, Cambridge, United Kingdom; 1: 25), were used to detect vimentin and desmin, respectively.

Table 1 - Primary antibodies used in the immunostaining of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) uterine samples.

Primary antibody	Identification and brand	Dilution
Anti-estrogen receptor (Alpha)	Ab32063, abcam, Cambridge, UK	1:50
Anti-progesterone receptor	Ab2765, abcam, Cambridge, UK	1:100
Anti-hCG receptor	Ab218447, abcam, Cambridge, UK	1:100
Anti-vimentin	Ab137321, abcam, Cambridge, UK	1: 100
Anti-desmin	Ab217895, abcam, Cambridge, UK	1:25

The samples then underwent two PBS baths for 5 min each followed by drying. Streptavidin was placed on the tissues for 30 min in a dark chamber at room temperature as a signal amplifier. After washing with PBS, the sample sections were developed with DAB (Substrate Kit - ACU 999, ScyTek Laboratories, Logan, UT, USA), washed with distilled water and counterstained in hematoxylin for 10 seconds. The sections underwent an increasing ethanol series (70%, 80%, 90%, 100% and 100%) and xylene clearing, and were mounted, analyzed and photo documented under a light microscope (LEICA DM 500 HD) with attached camera (LEICA ICC50W).

Results

After the pre-implantation phase, when the embryo has already invaded the uterine epithelium, the blastocyst becomes implanted in an antimesometrial position in the uterus, surrounded by stromal uterine tissue cells (Figure 1).

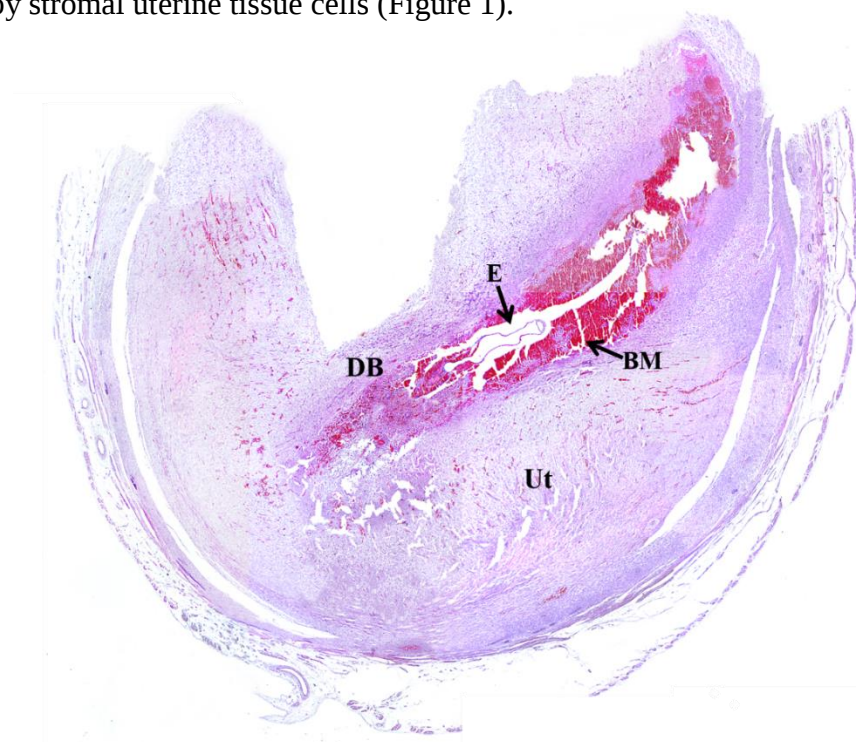


Figure 1 – Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) uterus on the 15th gestation day. The embryo (E) implanted in the implantation site is evident around a blood gap of maternal blood (MB) and surrounded by more eosinophilic decidual basalis cells (DB), differentiated from other uterine stroma cells (Ut). The embryonic pole is in the antimesometrial direction (*). HE staining.

After implantation, these uterine cells begin a differentiation process, increasing in size due to increased cytoplasmic volume, thus establishing the decidua or decidual region (Figures 1 and 2A).

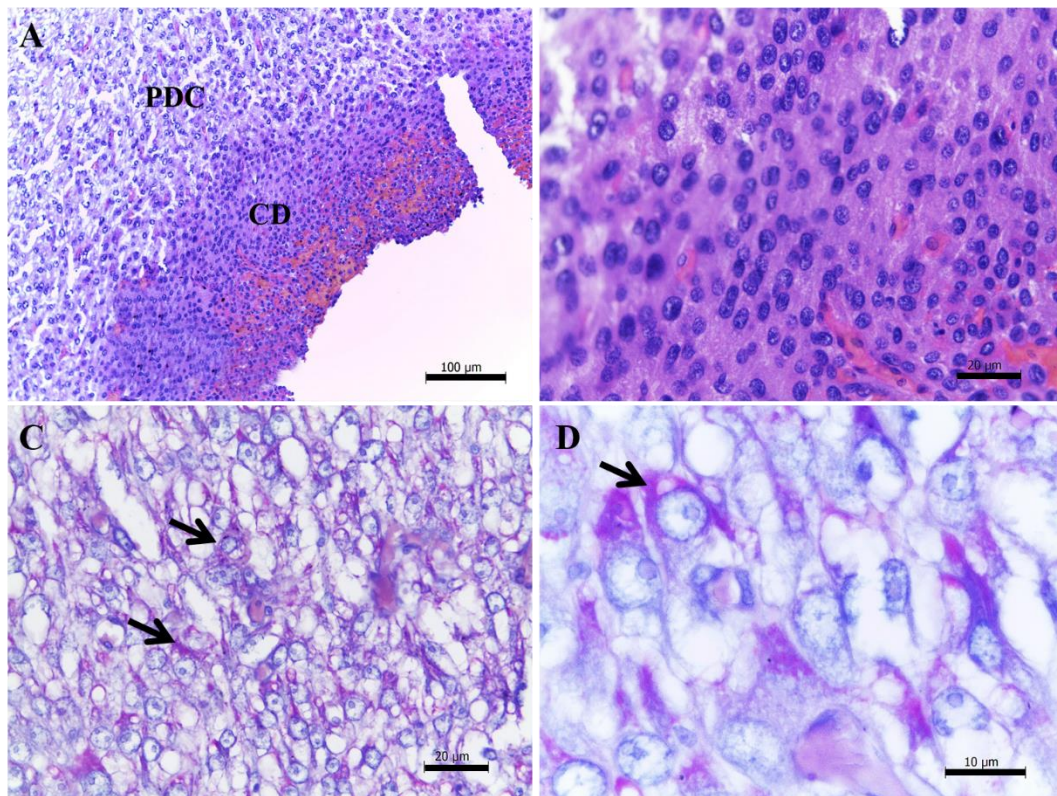


Figure 2 - (A and B) - Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) uterus on the 15th gestation day. The pre-decidual region is evident, containing pre-decidual cells (CPD). The the decidual region containing mature decidual cells (DC) close to the implantation area; (C and D) Positive PAS staining is noted close to decidual cell nuclei (Arrows). Bars: 100 µm, 20 µm, 20 µm and 10 µm, respectively. HE staining.

Cell cytoplasm was stained more intensely for both desmin and vimentin in the decidual region (Figures 3A and B). In contrast, desmin was stained weakly in the pre-decidual region, unlike vimentin, which was stained significantly in this region, as a result of different

cellular differentiation stages. Intense decidual cell staining was observed for progesterone, less evident in the pre-decidual region, in which a predominance of pre-decidual cells is observed. Stronger estrogen staining was observed in cells that make up pre-decidual regions (Figures 3C and D).

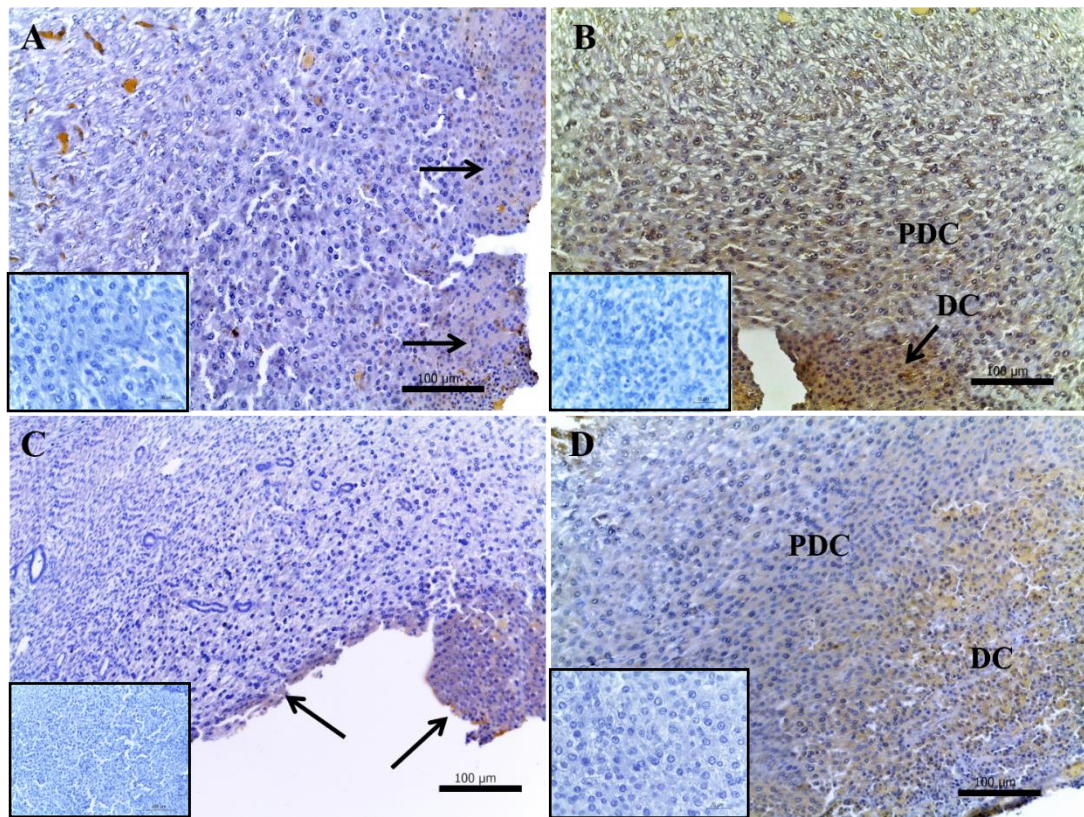


Figure 3 - (A) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) decidual cells on the 15th gestation day, stained for desmin. Note more evident staining in the decidual region (arrows); (B) Strong vimentin staining was labeling in pre-decidual (PDC) and mature decidual (DC) cells, located in the pre-decidual and decidual regions, respectively; (C) Progesterone staining in mature decidual cells, in the decidual region (arrows); (D) Estrogen staining in the pre-decidual and decidual region, in pre-decidual (PDC) and decidual (DC) cells. Insets in the photomicrographs represent negative controls. Bars: 100 µm, 100 µm, 100 µm and 100 µm, respectively.

Decidual cells were strongly stained for hCG (Figure 4A) in the trophoblastic cells of agouti embryos. These trophoblastic cells are easily differentiated from yolk sac cells, due to their positive staining (Figure 4B-D).

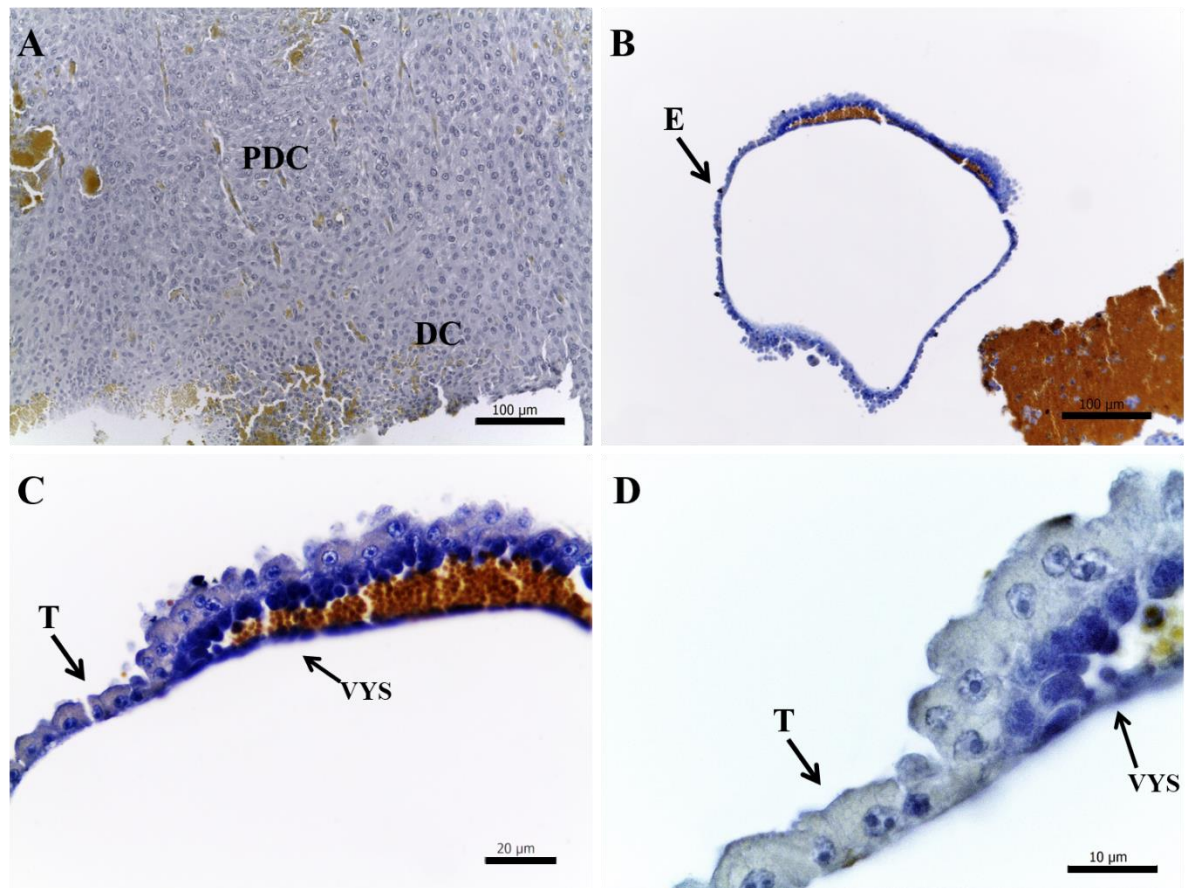


Figura 4 - (A) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) decidual cells on the 15th gestation day stained with hCG, with more evident staining noted in the decidual region (DC) compared to the pre-decidual cell region (PDC); (B-D) Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) embryo (E) on the 15th gestation day; (C and D) Embryonic trophoblastic cells (T) stained with hCG, forming a trilaminar layer next to the visceral yolk sac (VYS). Bars: 100 µm, 100 µm, 20 µm and 10 µm, respectively.

Discussão

Several phenomena are triggered between the maternal and fetal interphase in rodents, in which the embryonic implantation process is very invasive, including endometrium decidualization (Abrahamsohn e Zorn, 1993). During this process, a set of cellular differentiations occurs, culminating in the transdifferentiation of endometrial fibroblasts into decidual cells, and thus, cytoskeleton restructuring. The cytoskeleton is made up of several proteins, including vimentin and desmin (Favaro et al. 2014).

The expression of cytoskeletal markers, such as vimentin in decidual cells, indicates uterine stroma changes with the purpose of receiving the conceptus in the implantation process and consequent ontogenic process (Korgun et al. 2007). Herein, intense vimentin staining was

observed in uterine lining cells, both in the pre-decidual and decidual areas, on the 15th gestation day. This has been previously reported in early pregnancy rat studies, suggesting that vimentin may be a mesenchymal cell marker associated with cellular stability and the implantation mechanism, and less related to the decidualization process (Korgun et al. 2007). Furthermore, vimentin also plays an important role in cell migration (Chernoivanenko et al. 2013).

On the other hand, desmin, a protein that makes up the intermediate filaments of the intracellular cytoskeleton of striated and smooth muscle cells, where it acts as structural support (Favaro et al. 2014), is a good indication of deciduous cell staining in rodents (Glasser et al. 1987). A more intense staining was noted in the mature decidua region compared to the pre-decidual region. These findings are indicative that the decidua region is formed by specialized groups of cells subjected to the same physiological condition at the same time, guaranteeing subsequent gestation, assuming different functions. Other studies employing desmin as a decidual cell marker (Korgun et al. 2007; Yoshizawa et al. 2013) indicate a stronger expression of this filament in the antimesometrial region of the uterine stroma, a fact also observed herein in red-rumped agoutis.

Ovarian steroids, such as progesterone, are present during the gestation period, playing the important role of maintaining the pregnancy, both in humans and rodents (Aquilera et al. 2022; Oliveira et al. 2022). During the decidualization phase, progesterone acts by promoting the differentiation of uterine stromal cells into decidual cells (Martel et al. 1984; Yoshizawa et al. 2013), which makes the presence of this hormone essential in the early pregnancy stages.

The progesterone and estrogen staining observed herein in the initial agouti pregnancy phase demonstrates that the uterine stromal cells of this species are also subject to the action of these hormones. This condition is widely reported in research concerning immunohistochemical reactions with pregnant uterine tissue, indicating that both progesterone and estrogen act directly on the extracellular matrix, promoting the necessary uterine cellular structure changes with the aim of guaranteeing conceptus implantation success (Ramathal et al. 2010).

While some research suggests that ovarian estrogen is not necessary for implantation, and that the presence of progesterone alone is sufficient to stimulate uterus receptivity to the embryo (Harper et al. 1969; George e Wilson, 1978), others studies emphasize the role of the production of this hormone in contributing to uterine receptivity (Finn e Martin, 1970; Ozturk e Demir; 2010; Sandra, 2016). Thus, considering the strong estrogen staining noted in decidual cells in pregnant red-rumped agoutis, we infer that this hormone does indeed participate in the

mechanisms involving the embryo implantation and uterine epithelium differentiation process in this species.

The presence of progesterone during early pregnancy stages leads in endometrial hypertrophy resulting from an increase in the number and size of endometrial glands, increasing their secretory activity (Martins et al. 2020). Thus, the positive PAS staining in agouti decidua observed herein, may be correlated to hormonal stimuli. Studies concerning murine rodents have also reported positive PAS staining in decidua basalis cells (Coan et al. 2006).

Human chorionic gonadotropin (hCG) staining in the trophoblastic cells of red-rumped agouti embryos has not been described previously for this species. In humans, hCG can be produced both by trophoblastic cells at the beginning of pregnancy (D’hauterive et al. 2022), and by syncytiotrophoblast cells or invasive extravillous cytotrophoblast cells during the gestation period (Cole, 2009). Furthermore, its receptors can be found in some cell types, such as the smooth muscle of the myometrium and uterine endothelium decidua cells (D’hauterive et al. 2022). These results are consistent with the staining observed in red-rumped agouti decidual cells. hCG expression in agouti trophoblastic cells raises relevant questions concerning hormones indicative of pregnancy, similar to what occurs in humans. In rodents, such as agoutis, lactogenic hormones (PL-Is and PL-II) take on the responsibility of maintaining the corpus luteum for progesterone bloodstream secretion (Soares, 2004). In the context of gonadotropic hormone variations, it is interesting to note that, in horses, equine chorionic gonadotropin (eGC) is detected between 30 and 120 days gestation and is also produced by trophoblastic cells (Aggarwal et al. 1980).

Conclusão

The identification of cytoskeletal markers and hormones during the initial gestation phase of red-rumped agoutis indicate that cellular uterine endometrium changes in this period occur quickly and harmoniously in this species, aiming to guarantee successful embryo uterus implantation. This indicates the need for caviomorph rodent studies, aiming to better understand the reproductive biology of this group.

Acknowledgements. The authors would like to thank the Federal Rural University of Semi-Árido (UFERSA), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 25/2021), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financial Code 001).

Author contributions. JARAD participated in the manuscript's data interpretation and drafting, IRGL, ACFC participated in the data interpretation, POF, EKFL, ARS, JMAPA critical review of the manuscript and MFO participated in the critical review of the manuscript and final drafting.

Funding statement. This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors.

Competing interests. The authors declare there are no conflicts of interest.

Referencias

- Abrahamsohn PA, Zorn TMT** (1993) Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology*, **266**, 603-628.
- Aggarwa BB, Farmer SW, Papkoff H, Stewart F, Allen WR** (1980). Purification and characterization of the gonadotropin secreted by cultured horse trophoblast cells. *Endocrinology*, **106**, 1755-1759.
- Can A, Tekelioğlu, M, Baltaci A** (1995) Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta*, **16**, 261-275.
- Chernoivanenko IS, Minin AA, Minin AA** (2013) Role of vimentin in cell migration. *Russian Journal of Developmental Biology*, **44**, 144-157.
- Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC** (2006) Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**, 3280-3294.
- Cole LA** (2009). New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **7**, 8.
- D’hauterive SP, Close R, Gridelet V, Mawet M, Nisolle M, Geenen V** (2022) Human chorionic gonadotropin and early embryogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 1380.
- Favaro R, Abrahamsohn P.A, Zorn MT** (2014) Decidualization and endometrial extracellular matrix remodeling. In: *The guide to investigation of mouse pregnancy*. Academic Press, 125-142.
- Finn CA, Martin L** (1970) The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse. *Journal of Endocrinology*, **47**, 431-438.

- George FW, Wilson JD** (1978). Estrogen formation in the early rabbit embryo. *Science*, **199**, 200-201.
- Glasser SR, Lampelo S, Munir MI, Julian J.** (1987) Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Differentiation*, **35**, 132-142.
- Harper MJK, Dowd D, Elliott ASW** (1967). Implantation and embryonic development in the ovariectomized-adrenalectomized hamster. *Biology of reproduction*, **1**, 253-257, 1969.
- Korgun ET, Cayli S, Asar M, Demir RAMAZAN** (2007) Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *Journal of molecular histology*, **38**, 253-260.
- Lee Ky, Jeong Jw, Tsai Sy, Lydon Jp, Demayo Fj** (2007). Mouse models of implantation *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **8**, 234-239.
- Martel D, Monier MN, Psychoyos A, Defeo VJ** (1984) Estrogen and progesterone receptors in the endometrium, myometrium, and metrial gland of the rat during the decidualization process. *Endocrinology*, **114**, 1627-1634.
- Martins BB, Teixeira NS, Teixeira SA, Giannotti JG, Nunes LC, Freitas P, Machado-Neves M, Luz MR** (2020) Uterine secretory activity and histology of prepubertal female dogs in an animal model of partial ablation of endometrial glands development. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **40**, 134-140.
- Oliveira SFD, Greca CPS, Abrahamsohn PA, Reis MG, Zorn TMT** (2000) Organization of desmin-containing intermediate filaments during differentiation of mouse decidual cells histochemistry and cell biology, **113**, 319-327.
- Orwig KE, Rasmussen CA, Soares MJ** (1997) Decidual signals in the establishment of pregnancy: The prolactin family: A review. *Placenta*, **18**, 329-343.
- Ozturk, S, Drmir R** (2010). Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. *Histology and histopathology*.
- Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor, RN, Bagchi MK** (2010) Endometrial decidualization: of mice and men. In: *Seminars in reproductive medicine*. © Thieme Medical Publishers, 2010., 017-026.
- Sandra O** (2016) Hormonal control of implantation. In: *Annales d'Endocrinologie*. Elsevier Masson, 63-66.
- Soares MJ** (2004) The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2**, 1-15.

- Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Shikata N, Tsubura A.** Histopathological and immunohistochemical characterization of spontaneously occurring uterine deciduomas in young adult rats. *Journal of toxicologic pathology*, 26, 61-66.
- Zhang D, Wang Z, Luo X; Guo H, Qiu G, Gong Y, Gao H, Cui, S.** (2023) Cysteine dioxygenase and taurine are essential for embryo implantation by involving in E2-ER α and P4-PR signaling in mouse. ***Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14, 1-14.**

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo sobre o saco vitelino em cutias da espécie *Dasyprocta leporina* durante a fase inicial de gestação fornece valiosas informações sobre o desenvolvimento embrionário e a interação entre o embrião e o útero, caracterizando o começo de sua formação e destacando o início da inversão do saco vitelino entre os dias 14 e 15 de gestação. Além de identificar a presença de receptores hormonais de estradiol e progesterona, e de filamentos intermediários como desmina e vimentina nas células decíduais, evidenciando as modificações estruturais e hormonais que as células uterinas sofrem durante o processo de decidualização, essenciais para assegurar o sucesso reprodutivo e compreender melhor os processos biológicos subjacentes. Tais informações revelam a complexidade dos eventos que ocorrem durante o início da gestação. A aplicação de técnicas histológicas e imuno-histoquímicas avançadas destaca a importância da abordagem multidisciplinar para entender a biologia reprodutiva das espécies animais. Esses resultados têm implicações significativas não apenas para a reprodução das cutias, mas também para a conservação de roedores e possivelmente outras espécies animais.