UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DINÂMICA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO EM PREÁS *Galea spixii* Wagler, 1831

ANDRÉ MENEZES DO VALE
Farmacêutico Bioquímico

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Agosto – 2011

ANDRÉ MENEZES DO VALE

DINÂMICA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO EM PREÁS *Galea spixii* Wagler, 1831

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira-UFERSA

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Agosto – 2011

Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca "Orlando Teixeira" da UFERSA

V149d Vale, André Menezes do.

Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás *Galea spixii* Wagler, 1831 / André Menezes do Vale. -- Mossoró, 2011.

115f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de concentração: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Profº. Dr. Moacir Franco de Oliveira.

1.Saco vitelino. 2.Endoderma visceral. 3.Endoderma parietal. 4. Inversão. I.Título.

CDD:636.089

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB15 120

ANDRÉ MENEZES DO VALE

DINÂMICA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO EM PREÁS *Galea spixii* Wagler, 1831

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADO EM: 12/08/2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sc. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Orientador - Presidente

Profª. Dra. Sc. Maria Angelica Miglino (FMVZ/USP)
Primeira Conselheira

Prof. Dr. Sc. Luís Augusto Vieira Cordeiro (UFERSA)
Segundo Conselheiro

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA

Parecer N^0 08/2011 / PROCESSO N° 23091.001975/10-24
Data de Entrada: 28/09/2010 **Aprovado**: 25/03/2011

1. **Pessoal Responsável:**

Moacir Franco de Oliveira

2. **Título do Projeto:**

Inversão do saco vitelino em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831).

3. **Objetivo:**

Descrever a inversão do saco vitelino no preá, *Galea spixii* Wagler, 1831, bem como a sua morfofisiologia na fase inicial da gestação, utilizando dados de observações macroscópicas e técnicas de microscopia de luz, eletrônica de transmissão e de varredura.

4. **Considerações:**

O protocolo N^0 **23091.001975/10-24** está de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso Animal da UFERSA - CEUA. O pesquisador tem experiência nesta linha de pesquisa e o problema em questão tem relevância científica. O protocolo experimental está bem descriminado e coerente. O formulário está devidamente preenchido. O numero experimental de animais está coerente e os animais serão coletados em ambiente artificial, sem causar danos a populações naturais. Durante o desenvolvimento da pesquisa, os animais serão alimentados e acondicionados adequadamente. A metodologia de anestesia e eutanásia citada será realizada de acordo com a Resolução n° 714/2002 sendo o método de eutanásia aceitável e compatível com os fins desejados. Todo o procedimento de manipulação dos animais será realizado com acompanhamento técnico especializado.

5. **Parecer final:**

FAVORÁVEL à aprovação do projeto.

Mossoró, 25 de Março de 2011,

Prof. Carlos Campos Câmara
Presidente do CEUA

BR 110 – Km 47 – Bairro Pres. Costa e Silva – Caixa Postal 137
CEP 59625-900 – Mossoró – RN – (84) 3315-1769 – Fax (84) 3315-1778
www.esam.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ MENEZES DO VALE - Juazeiro do Norte/CE, 20/05/1980. Concluiu o ensino médio no colégio Hipócrates em Natal/RN. Possui graduação em Farmácia e Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2004). Foi monitor da disciplina de Farmacotécnica 1 e 2 no período de 01/03/2002 a 27/02/2004. Têm experiência nas áreas de Farmácia, Análises Clínicas, Hematologia e Citologia Clínica. É especialista em Citologia Clínica pela Universidade Potiguar e especialista em hematologia Clínica pela Universidade Federal do Ceará. Atualmente exerce o cargo de Farmacêutico bioquímico na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Em março de 2009, ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da UFERSA em nível de mestrado na área de Morfofisiologia.

DEDICATÓRIA

A **Deus** pela proteção, amor e força em todos os momentos da minha vida. Obrigado senhor por me abençoar todos os dias!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Diana Maria Moreira de Menezes** e **Pedro Sérgio Bezerra do Vale**. À minha irmã **Candice Menezes do Vale.** Vocês representam minha felicidade e sempre me apoiaram.

MUITO OBRIGADO!

DEDICATÓRIA

À minha vovó Ozir (*in memorian*). Sei que a senhora sempre teve orgulho de mim...

EPÍGRAFE

“Ser e permanecer verdadeiro para si mesmo e para os outros é possuir a qualidade mais nobre dos maiores talentos” (Johan Wolfgang Von Goethe).

AGRADECIMENTOS

A construção de um trabalho científico não representa tarefa fácil, no entanto, possibilita momentos de prazerosa leitura de artigos, intercâmbio de ideias, conceitos. Existem momentos de satisfação pelos resultados alcançados e situações de estresse quando os acontecimentos não saem como planejado. Em todo caso, torna-se importante a figura do orientador, nesse caso do **Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira**. Uma pessoa de grande inteligência, humildade e dignidade que valem a pena ressaltar. Tenho orgulho de você ter sido meu orientador e agradeço por tudo que fez por mim "Moa".

À **Professora Dra. Maria Angelica Miglino**, pelo apoio fundamental para que este trabalho fosse concluído. A sua enorme capacidade, inteligência e dedicação ao trabalho serviram de inspiração para a realização desta pesquisa.

À **Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)** e à **Universidade de São Paulo (USP),** por tornar possível a minha conclusão do Mestrado em Ciência Animal.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de realização das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

À **Alvanete Pereira Freire**, Pró-reitora de Recursos Humanos da UFERSA, por todo apoio nesse trabalho.

Ao **Hospital Veterinário Dix-huit Rosado Maia** e funcionários pelo incentivo e suporte durante o período do mestrado.

À **Professora Dra. Valéria Verás de Paula**, pelo incentivo no meu ingressar nesse curso de pós-graduação e pela realização dos procedimentos anestésicos nos animais do presente trabalho.

Ao **professor Dr. Benito Soto Blanco** pelos ensinamentos e auxilio tanto na estruturação deste trabalho quanto no desenvolvimento de outros.

Ao **Professor Dr. José Domingues Fontenele Neto** por tornar disponível o Laboratório de Histologia da UFERSA para o processamento do material coletado inicialmente no meu experimento, além de esclarecer muitas dúvidas que tive ao longo deste trabalho.

Ao **Professor Dr. Sidney Myoshi Sakamoto,** pela confiança e ajuda em tudo que precisei.

Ao **Professor Dr. Genilson Fernandes de Queiroz** pela minha liberação para o desenvolvimento de atividades relacionadas ao experimento.

Ao grande amigo **Erinaldo Freire de Amorim,** sua amizade, apoio e incentivo foram decisivos nessa minha jornada.

À minha namorada **Giovanna Carla de Oliveira Campos,** por todo amor, carinho e sinceridade. Você me deu força e foi muito paciente comigo.

Ao amigo **Antônio Carlos Lopes Câmara** por toda a ajuda concedida e as brincadeiras que promoveram descontração em momentos de dificuldade.

Aos amigos **Phelipe Oliveira Favaron** e **Márcio Nogueira**, muitas foram às vezes que vocês me ajudaram e tiraram minhas dúvidas.

Ao amigo **Gledson Benevides de Oliveira** pela ajuda em todo o processo deste trabalho.

À **Rejane dos Santos Sousa** pelo suporte e motivação na revisão da dissertação.

Aos amigos **Roberto Sávio Bessa da Silva e Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra** pelos ensinamentos e apoio neste trabalho.

Ao colega farmacêutico e amigo **Sérvulo Eduardo** por se mostrar sempre presente quando precisei fotomicrografar algumas imagens em microscopia de luz.

Aos funcionários do setor de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP: **Ronaldo Agostinho**, **Diogo Mader** e **Dra. Rose Elli**.

À **Maria Hermenegilda Souza de Freitas** e **Antônio Cézar de Lemos** pelo constante incentivo e apoio para que este trabalho pudesse ser concluído.

DINÂMICA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO EM PREÁS *Galea spixii* Wagler, 1831

VALE, A. M. **Dinâmica da inversão do saco vitelino em preás *Galea spixii* Wagler, 1831**. 2011. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

RESUMO: O período de inversão do saco vitelino bem como a dinâmica resultante deste processo foi estudado em 30 fêmeas de preás nos dias 6, 10, 11 a 15, 20, 25 e 30 de gestação. Foram formados seis grupos de animais numa relação de um macho para cinco fêmeas, mantidos em boxes de $5m^2$. Após formação dos grupos, diariamente eram realizados exames de citologia vaginal, para verificação de cópula, separando-se dos grupos as fêmeas que eram cobertas. A partir da ocorrência da cópula programaram-se as coletas dos sacos gestacionais mediante sacrifício das fêmeas gestantes através de protocolo anestésico específico. O material, então, era processado segundo técnicas para histologia convencional, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Nos dias de 11 a 13 de gestação observou-se o desenvolvimento dos endodermas parietal e visceral delimitando a cavidade do saco vitelino. O endoderma parietal foi evidenciado revestindo a superfície fetal da placenta corioalantoide bem como contornando o espaço delimitado pela decídua capsular. Estes endodermas apresentaram formato prismático e encontraram-se separados do trofoblasto por uma desenvolvida membrana de Reichert. Já o endoderma visceral continha vasos vitelínicos e possuía vilosidades apenas em determinadas áreas. No décimo terceiro dia, foi possível estabelecer como condição primordial antes da inversão, a permanência de pelo menos um dentre os três elementos que caracterizavam a onfalopleura bilaminar. No décimo quarto dia de gestação verificou-se a inversão do saco vitelino, caracterizada pela degeneração do endoderma parietal e trofoblasto mural, associado ao desaparecimento gradual da membrana de Reichert. Como consequência deste fenômeno, o endoderma visceral passou a constituir interface com o epitélio uterino. Após a inversão, o endoderma parietal que permaneceu íntegro foi aquele que se apoiava na superfície da placenta principal, apresentando células em formato colunar alto e característica de epitélio pseudoestratificado. O endoderma visceral apresentou numerosas vilosidades apicais principalmente em regiões próximas a placenta principal. A intensa vascularização desse endoderma foi evidenciada pela reação imunohistoquímica para vimentina e microscopia eletrônica de varredura. Com o contínuo desenvolvimento do embrião e placenta principal, observou-se o surgimento de importante área de aposição entre os endodermas visceral e parietal cuja capacidade proliferativa destas células foi demonstrada pela reação imunohistoquímica para o PCNA. Por conseguinte, concluiu-se que a inversão do saco vitelino representou uma disposição anatômica favorável ao desenvolvimento embrionário além de uma característica evolutiva nesta espécie de roedor.

Palavras Chave: Saco vitelino, Endoderma visceral, Endoderma parietal, Inversão.

DYNAMIC OF THE YOLK SAC INVERSION IN PREAS *Galea spixii* Wagler, 1831

VALE, A. M. **Dynamic of the yolk sac inversion in Preas *Galea spixii* Wagler, 1831**. 2011. 115f. Dissertação (Master's degree in animal science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2011.

ABSTRAT: The inversion period of the yolk sac as the dynamic which results from this process was studied in 30 female of prea on days 6, 10, 11 to 15, 20, 25, and 30 of gestation. Six groups of animals (one male for five females) were formed and kept in boxes of $5m^2$. Vaginal cytology was performed daily for detection of copulation. Pregnant females were separated of the other individuals of the group. They were euthanized using a specific anesthetic protocol for collection of the gestational sacs. Then, the material was processed for histology, immunohistochemistry, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. At days 11 to 13 of gestation was observed the development of the parietal and visceral endoderm delimiting the yolk sac cavity. The parietal endoderm was coating the surface of the fetal side of the chorioallantoic placenta and surrounding the space bounded by the capsular decidua. These endoderm layers showed a prismatic shape and were separated of the trophoblast by a developed Reichert's membrane. The visceral endoderm contained vitelline vessels and villi in some areas. On the 13^{th} day it was possible to establish as a basic condition before the inversion of teh yolk sac, the permanence of at least one of the three elements that characterized the bilaminar omphalopleure. On the 14^{th} day of gestation the complete inversion of the yolk sac, which was characterized by the degeneration of both parietal endoderm and mural trophoblast, coupled with the gradual disappearance of the Reichert's membrane was observed. As a consequence of this, the visceral endoderm constitutes the interface with the uterine epithelium. After the inversion of the yolk sac, the parietal endoderm remained intact was the one which rested on the surface of the chorioallantoic placenta, which showed high columnar cells, characteristic of the pseudostratified epithelium. The visceral endoderm showed numerous apical villi mainly in regions close to the chorioallantoic placenta. The intense vascularization was confirmed by the immunohistochemistry reaction for vimentin associated with the scanning electron microscopy. During the continuous development of the embryo and chorioallantoic placenta it was also observed the development of an important area of apposition of both visceral and parietal endoderm whose proliferative capacity of these cells was demonstrated by immunohistochemistry using PCNA antibody. Therefore, we concluded the inversion of the yolk sac represents an anatomical arrangement in favor of embryonic development as well as an evolutionary characteristic in this rodent specie.

Key words: Yolk sac, Visceral endoderm, Parietal endoderm, Inversion.

LISTA DE ABREVIATURAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
%	Porcentagem
P.A.S	Ácido periódico de Shiff
MEM	Meio mínimo essencial
IgG	Imunoglobulina G
anti-apoB	Anti-apolipoproteína tipo B
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ESAM	Escola Superior de Agricultura de Mossoró
ha	Hectare
S	Sul
W	Oeste
Gr	"Greenwich"
m	Metro
®	Marca registrada
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
mEq	Miliequivalente
M	Molar
pH	Potencial hidrogeniônico
ºC	Graus
HE	Hematoxilina e eosina
AT	Azul de toluidina
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
MHz	Mega-hertz
U.S.A	"United States of America"
CO_2	Dióxido de carbono
U	Útero
SVV	Saco Vitelino Visceral
PL	Placenta Corioalantoide
AM	Âmnio
BC	Blastocele
CE	Cone ectoplacentário
CA	Cavidade amniótica
MCI	Massa celular interna
TM	Trofoblasto Mural
EP	Endoderma parietal
EV	Endoderma visceral

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE	Celoma extraembrionário
CV	Cavidade do saco vitelínico
SG1	Saco gestacional 1
SG2	Saco gestacional 2
SG3	Saco gestacional 3
EMB	Embrião
DP	Decídua parietal
DB	Decídua basal
N	Núcleo
RM	Membrana de Reichert
SM	Sincício marginal
MBV	Membrana basal visceral
Fe^{2+}	Íon ferroso
Ca^{2+}	Íon cálcio
I^{131}	Iodo radioativo 131
MHC-1	Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe 1
MHC-2	Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe 2
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano tipo G
NK	Célula “Natural Killer”
ECL	*Erytrina cristagalli lectin*
^{14}C	Carbono 14 radioativo

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Exemplar de *Galea spixii* utilizado no experimento. Centro de Multiplicação de Animais Silvestres-UFERSA/RN 49

Figura 2 – Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerou-se o primeiro dia de gestação. Objetiva de 40X. Barra = 92 µm. Coloração panótica rápida 51

Figura 3 – Fases do ciclo estral em preás. Em A: Proestro. Observam-se uma célula intermediária (seta) e as demais, superficiais anucleadas com formato poligonal. Barra = 85 µm. B: Estro. Muitas células superficiais anucleadas poligonais e uma com núcleo picnótico (seta). Barra = 91 µm. C: início do metaestro. Aumento do número de células intermediárias poligonais apresentando núcleos com cromatina finamente granular. Notar a numerosa microbiota bacilar (setas). Barra = 93 µm. D: Fase intermediária do metaestro. Observar o predomínio de células intermediárias, uma delas binucleada (seta) e neutrófilos (cabeças de seta). Barra = 92 µm. E: Início do diestro. Predomínio de células parabasais redondas e regular quantidade de lactobacilos. Barra = 91 µm. Em F: Final do diestro representada por células basais redondas (descamadas de forma agrupada), e filamentos de muco vaginal (seta). Barra = 91 µm. Figuras de A até F: Coloração panótica rápida 53

Figura 4 – Sacos gestacionais de preá a termo. Em A: evidencia-se a parede do útero (U), saco vitelino visceral (SVV), placenta corioalantoide (PL) e âmnio (AM). Observar a estreita relação que o saco vitelínico mantém com o útero, âmnio e placenta. Em B: evidencia-se o cordão umbilical (seta) promovendo conexão entre o feto e placenta corioalantoide. O saco vitelino visceral (SVV) apresentou aparência vilosa, principalmente nas regiões próximas a placenta principal. Em C: Destaca-se a placenta corioalantoide (PL) com a face convexa voltada para o feto e a côncava voltada para o epitélio uterino. Observar as delgadas ramificações da vascularização do saco vitelino visceral (SVV) envolvida no suprimento sanguíneo para o feto (setas). A e B: amostras colhidas mediante perfusão com látex Neoprene 650 centrifugado, seguida da fixação em formaldeído a 10 %. Em C: amostra colhida a fresco 60

Figura 5 – Desenvolvimento inicial do blastocisto em preás. Em A: Blastocisto aos seis dias de gestação. Observar a proliferação da massa celular interna ou embrioblasto (seta preta) em um dos polos do blastocisto, a blastocele (BC) e o revestimento externo do trofoectoderma (seta vermelha). Barra = 95 µm. Coloração Azul de toluidina. Em B: Blastocisto aos 10 dias de gestação. Notar as células trofoectodérmicas apresentando vilosidades (seta preta) e uma região de multiplicação e desenvolvimento do cone ectoplacentário (CE). Observou-se também o início do revestimento interno da blastocele por células hipoblásticas (seta vermelha), delimitando a cavidade do saco vitelino. Barra = 91 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em C: Blastocisto aos 11 dias de gestação. Notar o formato alongado do blastocisto e sua localização na câmara de implantação. Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura. Em D: blastocisto aos 12 dias de gestação. Visualizar a cavidade amniótica (CA) envolvendo a

massa celular interna (MCI) (seta), o útero (U) e o surgimento de uma primitiva placenta corioalantoide (PL). Barra = 90 µm. Coloração Hematoxilina e eosina 63

Figura 6 – Disposição do endoderma parietal antes da inversão em preás aos 12 dias de gestação. Em A: Corte transversal do saco gestacional demonstrando o revestimento das células endodérmicas parietais na superfície da placenta corioalantoide (PL) (seta preta) e no útero (U) (seta vermelha). Barra = 90 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Corte transversal do saco gestacional evidenciando o revestimento endodérmico parietal no útero (U) e placenta principal (*). Observar a proeminente membrana de Reichert (setas) positiva para a reação do ácido periódico de Shiff. Barra = 200 µm. Ácido periódico de Shiff. Em C: Observar a membrana de Reichert (*) separando o endoderma parietal (EP) do sincício marginal da placenta corioalantoide (PL). Barra = 30 µm. Microscopia eletrônica de varredura. Em D: Observar o útero (U), o trofoblasto mural (TM) e os endodermas parietal (EP) e visceral (EV). Barra = 50 µm. Ácido periódico de Shiff 65

Figura 7 – Saco gestacional de preá aos 13 dias de gestação em situação anterior a inversão do saco vitelino. Observar o blastocisto (*) no interior da cavidade amniótica, o útero (U) e a cavidade do celoma extraembrionário (CEE). Notar que antes da inversão, o saco vitelino apresentou uma cavidade (CV) delimitada pelo endoderma parietal (EP) e visceral (EV). Evidencia-se o local onde os endodermas se encontram (seta vermelha). Verificar ainda que o endoderma visceral torna-se viloso em determinados locais (cabeças de seta). Barra = 108 µm. Coloração Hematoxilina e eosina 67

Figura 8 – Inversão do saco vitelino no décimo quarto dia de gestação em três sacos gestacionais de preás. Em A: Saco gestacional um (SG1). Notar o início da degeneração da onfalopleura bilaminar (*) e extravasamento de sangue materno (seta) no interstício entre placenta principal (PL) e útero (U). Barra = 141 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Saco gestacional dois (SG2). Observar a degeneração de células endodérmicas parietais (seta azul) e escassez da membrana de Reichert (seta preta) distribuída apenas em alguns locais do útero (U). Barra = 200 µm. Ácido periódico de Shiff. As figuras C e D fazem referência ao saco gestacional três (SG3). Em C: Observar a desorganização epitelial do endoderma parietal (setas) revestindo a superfície do útero (U) em região próxima à placenta principal (PL). Barra = 144 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em D: Notar a extrema degeneração de células parietais (setas) em localização distal a placenta principal (PL) e a presença do endoderma visceral (EV). Barra = 140 µm. Ácido periódico de Shiff 69

Figura 9 – Componentes do saco gestacional de preás aos 15 dias de gestação. Em A: Observar o embrião (seta), a cavidade do celoma extraembrionário (CEE) e a relação entre o endoderma visceral (EV) e o útero (U) após a inversão do saco vitelino. Barra = 91 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Notar a confluência entre o endoderma visceral (EV) e o útero (U). Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura 71

Figura 10 – Componentes do saco gestacional de preás aos 20 dias de gestação. Observar o desenvolvimento da placenta corioalantoide (PL), embrião (EMB) e âmnio (AM) resultando em aproximações dos endodermas visceral (setas) e parietal (*) na região da placenta principal. Notar ainda a decídua parietal (DP), estabelecida após a inversão do saco vitelino. Barra = 104 µm. Coloração Hematoxilina e eosina 72

Figura 11 – Relações de aposição entre os endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantoide (PL) em preás aos 25 dias de gestação. Em A: Observar a formação de tufos ou vilos do endoderma visceral com respectivos núcleos na posição basal da célula. Notar a membrana basal visceral (seta preta) e membrana basal serosa (seta vermelha) formando o alicerce do epitélio visceral. Barra = 127 µm. Coloração azul de toluidina. Em B: Evidenciar a disposição dos núcleos na posição basal da célula (setas) e a intensa vascularização vitelínica (*) do endoderma visceral. Barra = 200 µm. Reação imunohistoquímica para vimentina 74

Figura 12 – Relações de aposição entre o endoderma visceral (EV) e útero (U) em região distal à placenta corioalantoide (PL) em preás aos 25 dias de gestação. Em A: Observar as células endodérmicas viscerais dotadas de poucas vilosidades e apresentando núcleos (setas) na posição apical da célula. Barra = 125 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Visualizar a estreita relação entre endoderma visceral (EV) e útero (U). Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura 75

Figura 13 – Capacidade proliferativa dos anexos fetais e placenta principal em preás aos 30 dias de gestação. Em A: Observar a reação positiva para o PCNA nos núcleos das células parietais (setas vermelhas) e sincício marginal (setas pretas) da placenta corioalantoide. Barra = 200 µm. Em B: Notar o mesmo padrão de positividade (setas) nas células do endoderma visceral. Barra = 200 µm. Reação imunohistoquímica para o PCNA 76

Figura 14 – Saco gestacional aos 30 dias onde pode ser observada a disposição espacial do saco vitelino visceral (SVV) e sua inserção (seta) na placenta corioalantoide (PL). Notar ainda a localização da decídua basal (DB) e parietal (DP). O SVV mantém estreita relação com a PL e o útero caracterizando uma estrutura anatômica favorável aos processos absortivos. Barra = 1000 µm. Microscopia eletrônica de varredura 78

Figura 15 – Vascularização vitelínica de preás aos 30 dias de gestação em diferentes regiões anatômicas. A e C representam vasos vitelínicos situados na porção distal da placenta corioalantoide. B e D retratam vasos vitelínicos na região proximal desta placenta. Em A: Notar as numerosas ramificações e aspecto tortuoso dos vasos. Barra = 300 µm. Em B: Os vasos desta região apresentaram-se retilíneos e dispostos de forma paralela. Barra = 100 µm. Em C: Observam-se pontos de convergência vasculares, permitindo intensa distribuição capilar no endoderma visceral. Barra = 100 µm. D: Detalhe de dois vasos vitelínicos dispostos de forma paralela e as vilosidades do endoderma distribuídas entre estes vasos. Barra = 30 µm. Figuras de A até D: Microscopia eletrônica de varredura 79

Figura 16 – Projeções vilosas do endoderma visceral próximas à placenta corioalantoide de preás aos 30 dias de gestação. Observar as dobras dos vilos bem definidas caracterizando um epitélio especializado. Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura 80

Figura 17 – Células endodérmicas viscerais do saco vitelino invertido de preás aos 30 dias de gestação em diferentes regiões anatômicas. Em A: Evidenciaram-se numerosas projeções citoplasmáticas similares a pseudópodes em epitélio adjacente a placenta corioalantoide. Notar a variação de tamanho destas projeções. Barra = 10 µm. B: Em locais distantes da placenta, observaram-se células endodérmicas apresentando superfície externa lisa. Barra = 3 µm. Figuras A e B: Microscopia eletrônica de varredura 82

Figura 18 – Eletromicrografia da placenta vitelina parietal (EP) de preás aos 14 dias de gestação. Observar a predominância dos núcleos (N) na região basal da célula e numerosas microvilosidades apicais (setas). Notar ainda a membrana de Reichert (RM) apoiando o endoderma parietal e separando-o da placenta corioalantoide na região do sincício marginal (SM). Barra = 10 µm. Microscopia eletrônica de transmissão 84

Figura 19 – Eletromicrografia dos endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantoide em preás aos 13 dias de gestação. Observar as relações de aposição entre as células e as numerosas microvilosidades apicais (setas) proporcionando possíveis áreas de trocas entre os endodermas. Notar as áreas em que os dois epitélios mantém íntimo contato (*). Barra = 5 µm. Microscopia eletrônica de transmissão 85

Figura 20 – Eletromicrografia de células endodérmicas viscerais situadas próximas à placenta principal de preás aos 14 dias de gestação. Em A: Observar as numerosas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, localizadas principalmente na região infranuclear da célula. Notar a presença de mitocôndrias (setas amarelas) em áreas perinucleares, vesículas eletrodensas (setas pretas) e espaço intercelular (*). Barra = 2 µm. Em B: Detalhe de dois espaços intercelulares proeminentes, repletos de microvilosidades (setas pretas) direcionadas para a luz deste espaço. Notar ainda vesículas eletrodensas (setas amarelas) e uma grande vesícula (*), provavelmente de pinocitose. Barra = 1 µm. Microscopia eletrônica de transmissão 87

Figura 21 – Eletromicrografia do endoderma visceral (EV) distante da placenta corioalantoide em preás aos 14 dias de gestação. Em A: Observar uma célula endodérmica visceral arredondada contendo grande quantidade de vesículas eletrodensas na superfície citoplasmática (setas). Barra = 5 µm. Em B: um vaso vitelínico separado do endoderma por uma espessa membrana basal visceral (MBV). Barra = 10 µm. Microscopia eletrônica de transmissão 89

Figura 22 – Representação esquemática dos elementos que compõe o saco gestacional em situação anterior e após a inversão do saco vitelino. Em A: Disposição das membranas antes da inversão. Observar o útero, constituído pelas decíduas capsular (DC) e basal (DB). Evidenciar o trofoblasto mural (em amarelo), a membrana de Reichert (em azul) acompanhando todo o contorno do trofoblasto mural e ainda,

localizando-se na superfície fetal da placenta corioalantoide (PL). Em marrom, evidencia-se o endoderma parietal, contornando a membrana de Reichert e revestindo a superfície fetal da placenta principal. Em conjunto, trofoblasto mural, membrana de Reichert e endoderma parietal são denominados onfalopleura bilaminar. Observar o endoderma visceral (em branco) e as localizações da placenta corioalantoide e do embrião (EMB). Em B: Evidencia-se uma situação posterior à inversão, ocasionada pela degeneração da onfalopleura bilaminar, resultando em íntima relação entre o endoderma visceral e útero. Este último passa a ser constituído pelas decíduas parietal (DP) e basal. Em C: Detalhe das vilosidades dos endodermas parietal e visceral em região proximal a placenta corioalantoide, representando importantes locais para o intercâmbio de substâncias

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO 23
1.1 ASPECTOS GERAIS DOS ROEDORES 23
1.2 BIOLOGIA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831 24
1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE PLACENTAÇÃO 25
1.4 JUSTIFICATIVA 26

2 OBJETIVOS 28
2.1 GERAL 28
2.2 ESPECÍFICOS 28

3 REVISÃO DE LITERATURA 29
3.1 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO 29
3.2 ASPECTOS GERAIS DA PLACENTAÇÃO 32
3.3 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA NOS ROEDORES 36
3.4 FUNÇÕES DO SACO VITELINO NOS VERTEBRADOS 44

4 MATERIAL E MÉTODOS 48
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE 48
4.2 ANIMAIS AMOSTRADOS 50
4.3 CITOLOGIA VAGINAL 50
4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO 54
4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA 54
4.6 DETECÇÃO DA INVERSÃO 54
4.7 MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ 55
4.7.1 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS 56
4.8 MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 57
4.9 MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 57

5 RESULTADOS 59
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SACO VITELINO 59
5.2 MICROSCOPIA DE LUZ 61
5.2.1 O BLASTOCISTO 61
5.2.2 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL ANTES DA INVERSÃO DO SACO VITELINO 64
5.2.3 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL DURANTE A INVERSÃO DO SACO VITELINO 68
5.2.4 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL APÓS A INVERSÃO DO SACO VITELINO 70
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 77
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 83

6 DISCUSSÃO 91
6.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DA PLACENTA PRINCIPAL, ÚTERO E SACO VITELINO 93
6.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA PLACENTA CORIOALANTOIDE 93

6.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO BLASTOCISTO 94
6.4 A PLACENTA VITELÍNICA 95
6.5 PARADIGMA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO 102

7 CONCLUSÕES 106

REFERÊNCIAS 108

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DOS ROEDORES

A fauna de mamíferos brasileira constitui uma das mais ricas do mundo, sendo marcante a diversidade em que se encontra a ordem Rodentia. No entanto, os conhecimentos sobre a fauna de roedores bem como de sua biologia ainda são escassos (CADEMARTORI et al., 2008).

Os roedores compreendem animais com ampla capacidade de adaptação ecológica e grande variedade de espécies (BRASIL, 2002). As suas características reprodutivas mostram-se compartilhadas entre outros grupos de mamíferos, o que possibilita o estabelecimento de várias correlações filogenéticas entre as espécies (MOSSMAN, 1987).

Aproximadamente 44% de todos os mamíferos são representados por roedores, o que corresponde mais de 2000 espécies existentes. São animais com ampla variedade de formas e tamanhos, características próprias de dentição, crânio e mandíbula. Possuem esqueleto pós-cranial e um sistema zigomassetérico no qual o músculo masseter mostra-se bastante desenvolvido (WOLFF; SHERMAN, 2007). Não possuem dentes caninos, apresentando incisivos e molares separados por um espaço denominado diástema (BRASIL, 2002).

A principal característica desses animais refere-se a um par de dentes incisivos, em constante crescimento, cujo esmalte limita-se a superfície labial e a dentina, a porção lingual. Essas características de dentição e ainda a acomodação da mandíbula possibilitam a manutenção dos dentes sempre afiados para execução de atividades relacionadas à alimentação, escavação de túneis bem como para a própria defesa (WOLFF; SHERMAN, 2007).

São animais pertencentes à ordem Rodentia que por sua vez é dividida em cinco subordens: Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha, Anomaluromorpha e Hystricomorpha (WILSON; REEDER, 2005). Das 29 famílias existentes, 89% dos roedores distribuem-se em cinco famílias: Muridae representada por ratos e camundongos, Sciuridae englobando os esquilos, Echimyidae abrangendo ratos com espinhos, Heteromyidae constituída pelos

camundongos com bolsa e ratos canguru e a Dipodidae incluindo os camundongos saltitantes (WOLFF; SHERMAN, 2007). Já na ordem Hystricognathi estão inclusos as cutias, preás, pacas, capivaras, dentre outros (MOOJEN, 1952).

Os roedores são mamíferos placentados do tipo generalizado com hábitos principalmente terrestres e fossóricos, arbóreos de forma ocasional e semiaquáticos em menor proporção (MILLEY; GIDLEY apud MOOJEN, 1952).

São conhecidos pela reprodução rápida, podendo atuar como dispersores de sementes e ainda servir como fonte de alimento para predadores, sendo, portanto, importantes em muitos ecossistemas (WILSON; REEDER, 2005).

A heterogeneidade das espécies de roedores e facilidade com que muitas podem ser criadas em cativeiro possibilitam a escolha desses animais como modelos experimentais em estudos genéticos, ecológicos, demográficos e fisiológicos. Como resultado, estas informações fornecem subsídios para um melhor conhecimento dos aspectos ecológicos e evolutivos que por sua vez, moldam seus comportamentos sociais e reprodutivos (WOLFF; SHERMAN, 2007).

1.2 BIOLOGIA DO PREÁ *Galea spixii* Wagler, 1831

Os preás pertencem à subordem Hystricomorpha, família Caviidae e gênero *Galea.* Possuem as superfícies dorsal e ventral do corpo com cores variando entre cinza e branca respectivamente, com manchas infraoculares também brancas. Suas patas anteriores evidenciam quatro dígitos enquanto as posteriores possuem três. Já os pelos ungueais mostram-se pouco desenvolvidos (BONVICINO et al., 2008). Apresentam uma mandíbula bastante especializada possuindo em sua face externa uma crista para inserção do masseter lateral (MOOJEN, 1952). São desprovidos de cauda e apresentam os dentes incisivos de cor amarela, característica que os diferencia de outros roedores como os do gênero *Cavia* (BRASIL, 2002).

São encontrados em capinzais e serrotes de pedra, escondendo-se em locas e cercas de pedra (MOOJEN, 1952). Frequentemente estão associados ao clima semiárido e a vegetação

da caatinga no nordeste brasileiro (BONVICINO et al., 2008). As fêmeas gestantes constroem seus ninhos entre pedras e vegetação (OLIVEIRA et al., 2008) parindo em média, dois filhotes, duas vezes por ano (BRASIL, 2002).

As informações referentes às características reprodutivas nessa espécie, dentre elas, o modelo de placentação são importantes para o fornecimento de subsídios que viabilizem um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo desses animais em cativeiro e ainda garanta sua sustentabilidade.

1.3 A IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE PLACENTAÇÃO

O processo de implantação e o tipo morfológico de placenta são bastante variáveis entre os mamíferos, fato que têm levado pesquisadores a desenvolverem estudos comparativos de placentação na tentativa de evidenciar qual o tipo mais eficiente para o desenvolvimento embrionário.

Os aspectos evolutivos das membranas fetais, conduzindo a formação de um órgão placentário, possibilita o sucesso reprodutivo da ordem Rodentia. A riqueza de espécies fornece amplo número de modelos experimentais que possibilitam um conhecimento maior do potencial reprodutivo desses animais. No entanto, o número de espécies estudadas, do ponto de vista da placentação, não ultrapassa três por cento das espécies recentes de roedores (MESS, 2003).

A utilização de roedores em pesquisas envolvendo aspectos funcionais da placenta seja ela corioalantoide ou vitelínica, estão cada vez mais requisitadas mediante as vantagens apresentadas por esses animais. A maioria deles possui pequeno porte e curto período de gestação podendo gerar grandes ninhadas (CARTER, 2007).

Os estudos de placentação com modelos animais podem produzir informações acerca da placentação humana, proporcionando a compreensão de muitas doenças que possam ocorrer na vida pré-natal (CARTER, 2007). Outras pesquisas descrevem as características morfológicas placentárias, estabelecendo correlações filogenéticas entre as espécies na tentativa de entender a evolução da placenta nos mamíferos (MESS; CARTER, 2007). Além

disto, a forma como as membranas fetais interagem com os tecidos maternos revela informações relacionadas à fisiologia pré-natal, transferência de anticorpos maternos para o feto e ainda distúrbios no desenvolvimento fetal (MOSSMAN, 1987).

A placenta coriovitelínica, formada pela fusão do córion com o saco vitelino, representa uma característica ancestral sendo definitiva em marsupiais, e temporária nos mamíferos eutérios. Nestes, uma placenta corioalantoide logo se estabelece para o desempenho de funções necessárias ao desenvolvimento do concepto (CARTER, 2001). A maioria dos roedores possui uma placenta hemocorial do tipo labiríntica além de uma placenta vitelínica invertida (MOSSMAN, 1987).

O saco vitelino invertido de roedores desempenha várias funções podendo-se destacar aquelas relacionadas ao armazenamento, absorção e transferência de nutrientes. De fato, distúrbios nestas funções produzidas por agentes teratogênicos, por exemplo, podem explicar possíveis doenças no recém-nascido (JOLLIE, 1990). Esses mecanismos podem ser mais bem compreendidos pelo conhecimento da morfofisiologia do saco vitelino e o consequente processo de inversão dessa membrana fetal.

1.4 JUSTIFICATIVA

O aumento da consciência pela preservação da biodiversidade, considerando inclusive a particularidade de cada ecossistema nacional, tem levado estudiosos a desenvolverem pesquisas com animais silvestres. No entanto, trabalhos sobre a biologia reprodutiva envolvendo aspectos anatômicos e morfofisiológicos passaram a ser desenvolvidos apenas na ultima década.

A maioria dos trabalhos com roedores avalia a frequência das espécies em determinada área geográfica, o comportamento social associado à interação com o ambiente, a duração do período reprodutivo e ainda o papel desses animais como vetores de zoonoses. Estudos que visem abordar as características reprodutivas desses animais, em especial o papel das membranas fetais e a consequente interação com os tecidos maternos, de forma a garantir o pleno desenvolvimento do concepto ainda são considerados escassos.

É sabido que no início do desenvolvimento embrionário, em roedores, a principal estrutura envolvida nas trocas entre mãe e feto é a placenta vitelina. No entanto, pouca atenção tem sido dada a esta membrana talvez pelo fato de que nos humanos a mesma sofre rapidamente um processo de involução. Nos roedores, o saco vitelino participa ativamente de todos os processos de trocas materno fetais, persistindo durante todo o período gestacional.

Igualmente intrigante é o processo de inversão do saco vitelino que gera muitos questionamentos ao pesquisador que tenta evidenciar se existem vantagens neste fenômeno do ponto de vista evolutivo. A inversão total do saco vitelino possibilita que o endoderma visceral fique exposto ao conteúdo secretório do útero. Em algumas espécies ocorre apenas uma inversão parcial, com o endoderma parietal em aposição aos tecidos maternos.

Alguns trabalhos já descreveram o processo de inversão do saco vitelínico, no entanto, pesquisas mais detalhadas que retratem o período em que ocorre e as implicações causadas por esse fenômeno são considerados escassos. Desta forma, o presente trabalho é justificado pela produção de novas informações capazes de serem confrontadas com aquelas já descritas por outros autores gerando novos entendimentos relativos a esse processo.

2 OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Descrever a inversão do saco vitelino no preá *Galea spixii* Wagler, 1831, bem como a sua morfofisiologia na fase inicial da gestação, utilizando dados de observações macroscópicas e técnicas de microscopia de luz, eletrônica de transmissão e de varredura.

2.2 – ESPECÍFICOS

a) Caracterizar macroscopicamente o saco vitelínico de preás em gestação a termo;

b) Descrever com base na microscopia de luz os componentes teciduais do saco vitelínico de preás na fase inicial da gestação;

c) Descrever o saco vitelínico de preás na fase inicial da gestação, com base na microscopia eletrônica de varredura;

d) Caracterizar os componentes celulares do saco vitelínico de preás em início de gestação, com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão;

e) Caracterizar a inversão do saco vitelino em preás e definir o período em que a mesma ocorre;

f) Comparar os dados obtidos neste trabalho com aqueles já determinados em outros roedores;

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para a revisão bibliográfica procurou-se seguir uma sequência de assuntos que abordassem o início do desenvolvimento embrionário, formação da placenta e diversas características do saco vitelino em roedores. Desse modo, após a argumentação de alguns eventos biológicos, estabeleceram-se como foco principal as informações sobre o saco vitelino a fim de melhor integrar os aspectos teóricos explicitados com os principais objetivos do presente trabalho.

3.1 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A fecundação marca o início do período embrionário que é caracterizado por sucessivas divisões mitóticas associadas a processos de polarização e compactações celulares. Quando o zigoto sofre as sucessivas clivagens, surgem numerosas células pequenas denominadas blastômeros no estágio de mórula (CROSS et al., 1994; SCHALAFER et al., 2000).

Para o sucesso reprodutivo de uma espécie, cria-se um estágio de pós-fertilização com amplas alterações genômicas dos organismos materno e fetal favorecendo rápidas diversificações nas interações entre os tecidos uterinos e fetais. Essas características possibilitam a formação de diversos tipos de placenta nos mamíferos eutérios (CRESPI; SEMENIUK, 2004).

O processo de implantação do blastocisto envolve uma série de eventos que o conecta aos tecidos maternos. Tal ligação é essencial para o subsequente desenvolvimento embrionário (CROSS et al., 1994). Para tanto, é necessário que o óvulo fertilizado, ainda envolto por uma camada de mucopolissacarídeo – a zona pelúcida –atravesse o oviduto e alcance à luz uterina (PERRY, 1981; CROSS et al., 1994).

As membranas fetais se desenvolvem na dependência do modo de implantação, também conhecido como nidação, ocorrendo de forma variável entre as espécies. Na nidação

superficial, geralmente o blastocisto tem aspecto distendido e permanece em contato com a luz uterina. Os roedores desenvolvem, em alguns casos, uma implantação intersticial onde o blastocisto mostra-se pequeno, invade o epitélio luminal e desenvolve-se no estroma endometrial (PERRY, 1981; MOSSMAN, 1987).

Durante a implantação em roedores, células trofoblásticas produzem vários fatores de adesão para o endométrio. Ocorrem modificações do estroma uterino, recrutamento de células inflamatórias, endoteliais e processos apoptóticos do epitélio uterino (DENKER, 1993). Forma-se uma reação decidual nas quais células maternas localizadas nos locais da implantação tornam-se carregadas de glicogênio e lipídios, revelando um aspecto estrutural poliédrico (CROSS, 1998).

Quando a implantação realiza-se no lado antimesometrial do útero, observam-se, nesses locais, células uterinas com coloração pálida, núcleos pequenos e citoplasma revelando poucas granulações caracterizando um epitélio predisposto à degeneração (SANSOM, 1922).

A decídua basal refere-se ao tecido uterino situado abaixo do blastocisto, ou seja, entre este e o miométrio. Sobrejacente ao útero desenvolve-se uma decídua capsular, localizada entre o blastocisto e a luz uterina, sendo a porção restante conhecida como decídua parietal (ENDERS, 1991).

O blastocisto é formado quando a mórula desenvolve uma cavidade central cheia de líquido (blastocele) e perde a zona pelúcida. As células do trofoectoderma, também conhecidas como trofoblásticas, formam a parede externa do blastocisto e assumem funções especializadas, sendo essenciais para o processo de implantação e produção de hormônios necessários ao reconhecimento materno da gestação (CROSS et al., 1994).

O embrião deriva das células mais internas da mórula, denominando-se massa celular interna ou disco embrionário. Este por sua vez, se dispõe em camadas localizadas num pólo da cavidade do blastocisto. Posteriormente, células endodérmicas crescem da massa celular interna para revestir a cavidade da blastocele (futuro saco vitelino). Uma camada de mesoderma irá se estender entre o trofoectoderma e o endoderma (JOLLIE, 1990; SCHALAFER et al., 2000).

A fase de gástrula caracteriza-se por ser um período crítico para o desenvolvimento dos vertebrados. O disco embrionário sofre um processo de rearranjo estrutural para em seguida formar as camadas germinativas. Durante os estágios tardios de clivagem, os

blastômeros localizados centralmente a mórula, subdividem-se em duas populações celulares de tamanhos distintos (NODEN; DE LAHUNTA, 1985). Assim, as células da massa celular interna ou embrioblasto se diferenciam em hipoblasto e epiblasto formando um blastocisto bilaminar. As células do hipoblasto originam o endoderma extraembrionário que após sua formação, reveste a cavidade da blastocele, delimitando a cavidade do saco vitelino (MOSSMAN, 1987; JOLLIE, 1990; GILBERT, 2003).

Outra cavidade começa a ser formada no embrioblasto, constituindo os primórdios da cavidade amniótica. O assoalho dessa cavidade está representado por células epiblásticas as quais possibilitam a separação de uma pequena quantidade de células amnioblásticas para a produção de uma membrana delgada, o âmnio. Assim, a cavidade amniótica surge como um espaço entre o trofoblasto e o embrioblasto (LEISER; KAUFMANN, 1994; CROSS, 1998). O âmnio circunda todo o embrião com exceção do anel umbilical e confere proteção mecânica ao organismo embrionário quando produz o fluido amniótico (PERRY, 1981).

Nos roedores miomorfos e histricomorfos a amniogênese resulta de um processo de cavitação pela localização interna do embrioblasto no blastocisto. Este fenômeno faz com que o embrião sofra um arqueamento em direção a cavidade do saco vitelino. Neste momento, o disco embrionário localiza-se entre a cavidade amniótica e o saco vitelino. Com o subsequente desenvolvimento, várias células epiblásticas convergem e proliferam para o plano mediano da porção caudal do embrioblasto formando a linha primitiva. Esta estrutura possibilita a identificação do eixo cefálico-caudal do embrião (MOSSMAN, 1987).

O sulco primitivo origina-se pela invaginação de células do epiblasto tornando possível a saída de algumas células em direção ao hipoblasto. A pequena depressão gerada pelo sulco primitivo prolonga-se até a extremidade cefálica da massa celular interna numa estrutura referida como nó primitivo. Algumas células epiblásticas da linha primitiva deslocam células do hipoblasto originando a endoderme embrionária. As que permanecerem no epiblasto formando o alicerce da cavidade amniótica originarão o ectoderma intraembrionário. No entanto, a maioria das células do epiblasto da linha primitiva se diferencia em células mesenquimais para a produção do mesoderma extraembrionário (NODEN; DE LAHUNTA, 1985; GILBERT, 2003).

A placenta é formada a partir de quatro estruturas membranosas diferentes: o âmnio, córion, saco vitelino e alantoide. A parede externa do blastocisto torna-se revestida por uma

camada de mesênquima derivada do embrião resultando no córion. O âmnio é constituído por uma camada epitelial de natureza ectodérmica, porém nunca desenvolve vasos. O saco vitelino consiste de células endodérmicas, sendo o segmento visceral vascularizado por vasos vitelínicos provenientes de mesênquima próprio. A alantoide encontra-se constituída por mesoderma ricamente vascularizado possibilitando as trocas gasosas nos mamíferos eutérios (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.2 ASPECTOS GERAIS DA PLACENTAÇÃO

Para Mossman (1987), a grande diversidade das membranas fetais nos organismos euterianos motiva o pesquisador a estabelecer estudos comparativos destas estruturas. O grande desafio situa-se na verificação de vários pontos de vista, seja com relação aos aspectos evolutivos, genéticos ou fisiológicos. Ambos podem verificar as razões para tais diferenças culminarem com um órgão placentário que desempenha as mesmas funções básicas.

De acordo com Schneider (1996), a placenta constitui um órgão único, com uma variedade de funções posteriormente assumidas na vida pós-natal por diferentes órgãos.

A formação de um órgão placentário resulta na presença de compartimentos e membranas responsáveis pela nutrição, excreção e mecanismos de proteção ao feto. Apesar de estudos já retratarem a estrutura fina das células que compõe a placenta, os processos de regulação e transporte específicos de algumas substâncias ainda carecem de maiores detalhes (CHAN; WONG, 1978).

Assim, este órgão biológico apresenta vários tipos celulares que desempenha um papel crítico na manutenção, proteção e crescimento do feto. Dentre inúmeras funções atribuídas a placenta destaca-se como primordial a transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, além da eliminação de catabólitos fetais no sentido inverso. Também constitui uma barreira protetora contra patógenos e sistema imune materno e ainda um importante órgão endócrino capaz de sintetizar hormônios, fatores de crescimento, citocinas e outros produtos bioativos (GEORGIADES et al., 2002).

As interações maternofetais são possíveis devido à formação de regiões especializadas denominadas de interface maternofetal. Nestes locais, existe estreita associação entre as células dos dois indivíduos para a formação da placenta. Esta interação possibilita o crescimento e viabilidade fetais (MESS; CARTER, 2007).

Para favorecer o processo de trocas fisiológicas, células trofoblásticas externas associam-se ao mesoderma vascularizado formando o córion. Seguindo-se de uma estreita conexão com os vasos umbilicais da alantoide, é favorecido o desenvolvimento de uma placenta principal (corioalantoide) em muitas espécies de mamíferos. Além disso, é importante citar a persistência do saco vitelínico em roedores, podendo este anexo fetal sofrer inversão parcial ou total (CARTER et al., 2004).

Em grande parte das espécies de mamíferos eutérios há o desenvolvimento de duas placentas em potencial. A placenta vitelina precede a formação da coriolantoide, sendo mais suscetíveis as trocas nutricionais e síntese de proteínas do que ao intercâmbio respiratório (ENDERS, 2009). Desta forma, o termo placenta não se limita ao desenvolvimento de uma estrutura corioalantoide como ocorre em humanos, mas corresponde também a outros tipos de placentação como a vitelínica (MESS; CARTER, 2007).

Leiser e Kaufmann (1994) argumentam que a placenta é formada por um complexo sistema de membranas nutricionais proporcionados pela aposição ou fusão das membranas fetais com a mucosa uterina. O intuito dessas interações encontra-se no favorecimento das trocas maternofetais.

Para que essas interações ocorram uma grande variedade de estruturas placentárias têm se desenvolvido entre as espécies de mamíferos. Diante dessas características, várias classificações foram estabelecidas compreendendo: o tipo e número de membranas envolvidas, a forma externa da placenta, os padrões geométricos das interdigitações entre as superfícies maternas e fetais, o tipo e número de camadas teciduais que separam os sangues maternos e fetais e o arranjo geométrico dos vasos (LEISER; KAUFMANN, 1994; MESS; CARTER, 2007).

Quando o trofoblasto encontra-se em aposição ao tecido uterino, a placenta é descrita como epiteliocorial devido às células trofoblásticas ficarem expostas ao epitélio luminal do endométrio. Ocorrem em porcos, camelos e cavalos. Na placentação sinepteliocorial, células trofoblásticas especializadas migram através do epitélio uterino, sendo evidenciadas em

bovinos e ovinos. Porém, se o epitélio uterino for perdido e o trofoblasto invadir a lâmina basal, entrando em contato com os vasos sanguíneos uterinos, forma-se uma placenta endoteliocorial. Como representantes deste último tipo, citam-se os carnívoros e alguns morcegos. A placenta hemocorial, reconhecidamente presente em humanos e roedores, representa o maior estado de invasão trofoblástica. Neste caso, ocorre destruição das células endoteliais, ficando o trofoblasto em contato direto com o sangue materno. Pode ser mono, di ou tricorial, dependendo do número de camadas de trofoblasto presente (ENDERS et al., 1998; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

Nos mamíferos eutérios, os diversos tipos de placenta possibilitam o aumento da área de contato entre as superfícies materna e fetal pela formação de interdigitações entre os dois tecidos. Se tais interdigitações distribuírem-se por toda a superfície do saco coriônico, a estrutura resultante é denominada placenta difusa sendo encontradas em porcos e cavalos. Quando a referida organização maternofetal distribuir-se de forma agrupada em determinado local na estrutura placentária, lembrando o aspecto de um disco, a placenta é denominada discóide, sendo evidenciadas em humanos e roedores. Em ruminantes, observa-se o desenvolvimento de estruturas especializadas na placenta (os cotilédones) que por sua vez interagem com regiões específicas no endométrio (as carúnculas) para aumentar a superfície de absorção (CROSS et al., 2003).

Em castores e roedores do gênero *Aplodontia* desenvolve-se uma placenta coriovitelínica pela aposição do epitélio coriônico com o saco vitelino nos estágios iniciais da gestação. Em outros roedores, porções distais do endoderma visceral que reveste todo o embrião apresentam falhas ou alterações degenerativas, no transcorrer da gestação, caracterizando uma inversão total do saco vitelino (STARCK, 1959). Assim, muitas espécies de roedores apresentam uma placenta vitelina atuando simultaneamente com uma placenta corioalantoide (KING, 1992).

A placenta é denominada labiríntica quando projeções trofoblásticas encontram-se interconectadas, deixando estreitos canais para a passagem de sangue materno (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

A placentação em mocós (*Kerondon rupestris*) foi elucidada por Oliveira (2006) a partir de análises macroscópicas, microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão. Nesse estudo foi possível descrever a placenta daquele animal como corioalantoide

constituída por lóbulos placentários caracterizados, por sua vez, como regiões de labirinto e centro do lóbulo, sendo toda a estrutura lobular delimitada pelo interlóbulo. O labirinto apresentou capilares fetais distribuídos radialmente em relação ao centro do lóbulo. Esse último era constituído por artéria materna, veia fetal e lacunas maternas.

Da mesma forma foram caracterizadas no porquinho da Índia as porções da placenta, compostas por sincício marginal, interlóbulo e lóbulos representados pelo labirinto e centro lobular (KAUFMANN, 1969).

O adequado desenvolvimento e integridade do concepto dependem diretamente do fornecimento e manutenção de um fluxo sanguíneo materno para os espaços intervilosos. Os vasos maternos e fetais formam uma rede tridimensional de capilares e espaços sanguíneos, onde o fluxo sanguíneo pode seguir por vários mecanismos (BROSENS et al., 1967).

O fluxo concorrente ou de corrente a favor apresenta os capilares maternos e fetais dispostos de forma paralela, sendo o percurso dos sangues maternos e fetais dispostos na mesma direção. No fluxo de contracorrente, os capilares de ambos os organismos situam-se arranjados de forma paralela, porém os sangues fluem em direções opostas. Este último representa um sistema mais eficiente de troca maternofetal (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Outra classificação morfológica refere-se aos tipos de membranas fetais envolvidas na formação da placenta. No inicio do desenvolvimento de todos os mamíferos e no final da gestação dos primatas superiores, desenvolve-se uma placenta coriônica, não vascularizada. Nos animais carnívoros, origina-se uma placenta coriovitelínica na qual a membrana coriônica encontra-se conectada com a circulação fetal através dos vasos vitelínicos. No entanto, na grande maioria dos mamíferos, forma-se uma placenta corioalantoide, onde a membrana do córion liga-se a circulação fetal pelos vasos oriundos da alantoide (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placenta vitelina revela grande importância como um complexo sistema de membranas dotadas de várias funções, principalmente no início do desenvolvimento embrionário (MOSSMAN, 1987).

Estudos de placentação em preás desenvolvidos por Oliveira et al. (2008) foram descritos a partir de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. A análise macroscópica revelou uma placenta corioalantoide situada no lado antimesometrial do útero. Na fase inicial da gestação, a placenta consistiu em espongiotrofoblasto destituído de vasos sanguíneos e posteriormente, observou-se uma estrutura discoidal com bordas deciduais

definidas apresentando espongiotrofoblasto, labirinto e subplacenta. Na gestação avançada à placenta se mostrou altamente lobulada, vilosa com o labirinto sendo a área mais proeminente das trocas maternofetais. Nesse momento, o espongiotrofoblasto e a subplacenta estavam reduzidos de tamanho. Padrões de crescimento celular revelaram inicialmente camadas de citotrofoblasto com nítidos contornos celulares apoiados no mesênquima fetal. A essas células, seguiu-se o sinciciotrofoblasto direcionado para os canais de sangue materno. Nesse estudo, descreveu-se em detalhes uma estrutura denominada subplacenta. No inicio da gestação, observou-se confluência entre a subplacenta e a placenta corioalantoide, característica modificada com o subsequente desenvolvimento embrionário no qual a subplacenta constituía um distinto órgão.

A subplacenta do porquinho da Índia tornou-se alvo de estudos ultraestruturais e de microscopia de luz em vários estágios de gestação. Verificou-se que a origem da subplacenta consistia na proliferação de duas ou três camadas de células citotrofoblásticas sobre o mesênquima fetal da escavação central. O citotrofoblasto apresentava núcleos volumosos, nucléolo proeminente e citoplasma finamente granular com poucas mitocôndrias. Essas células proliferavam e produziam sinciciotrofoblasto dotado de várias microvilosidades. Os autores desse trabalho ainda especularam sobre possível função gonadotrófica e de transferência de substâncias de alto peso molecular da decídua para a circulação fetal pela subplacenta (DAVIES et al., 1961).

3.3 PLACENTAÇÃO VITELÍNICA NOS ROEDORES

Cross et al. (1994) mencionam o processo de implantação, desenvolvimento das membranas fetais e estabelecimento de uma placentação vitelina e corioalantoide. Descrevem que após a implantação intersticial do blastocisto, células do trofoblasto mural situadas em um dos polos, proliferam para a formação do cone ectoplacentário. Este trofoblasto se diferencia em células trofoblásticas gigantes produzindo uma interface com as células maternas da decídua. Concomitantemente, células hipoblásticas revestem a blastocele constituindo a cavidade do saco vitelino.

Dessa forma, o saco vitelino é formado por um segmento parietal, adjacente ao trofoblasto e visceral, próximo ao embrião. A placenta vitelina parietal apresenta uma camada de células endodérmicas, separadas do trofoblasto por uma espessa membrana basal, referida como membrana de Reichert. Pela conformação bilaminar de ectoderma e endoderma, a membrana parietal também recebe a denominação de onfalopleura bilaminar (HAAR; ACKERMAN, 1970).

A maior porção da membrana parietal relaciona-se ao trofoblasto mural adjacente, sendo reconhecida como saco vitelino parietal capsular, pois se encontra em aposição a decídua capsular. Existe também um pequeno segmento de membrana parietal que reveste a superfície da placenta corioalantoide sendo caracterizado como placenta vitelina parietal (JOLLIE, 1968).

Wislocki e Padykula (1953) ao descreverem a topografia da onfalopleura bilaminar, caracterizaram dois tipos de endodermas parietais que se encontravam presentes em embriões de ratos Norway estudados do dia dez até o vigésimo primeiro dia de gestação. Destacaram uma camada de endoderma parietal revestindo a superfície da placenta corioalantoide e outra camada de endoderma associada ao trofoblasto mural da decídua capsular. Em ambos os casos, uma membrana basal de Reichert localizava-se entre as células endodérmicas parietais e o trofoblasto. Para Mossman (1937) a membrana de Reichert constitui uma membrana basal hialina, localizada entre o endoderma parietal do saco vitelino e o trofoblasto.

O constituinte primordial da membrana de Reichert é o colágeno compactado e algumas moléculas de natureza glicoprotéica, possibilitando a afinidade dessa membrana por corantes ácidos ou que contenha prata, sendo importantes as colorações de Masson e ácido periódico de Shiff (P.A.S) para visualização dessa membrana (WISLOCKI et al., 1946).

Ensaios *in vitro* visando os aspectos funcionais do endoderma parietal foram realizados em embriões de ratos Wistar de 12 a 16 dias de gestação. Para constatação da síntese de proteínas, incubou-se o endoderma parietal com aminoácido radioativo [14C] prolina, seguida de medições radioativas de ^{14}C incorporado e taxa de produção de 4-hidroxi [^{14}C] prolina. Para verificação da biossíntese do colágeno, foi adicionado ao referido endoderma o composto [^{14}C] lisina. Dessa forma, os autores do experimento puderam constatar que as células endodérmicas parietais do saco vitelino participavam da biossíntese da membrana de Reichert (CLARK et al., 1975).

A placenta vitelina visceral reforça-se pelo desenvolvimento do mesoderma extraembrionário que se localiza abaixo da membrana basal visceral. Por conseguinte, a disposição trilaminar do endoderma visceral, mesoderma e ectoderma extraembrionários caracterizam a esplancnopleura extraembrionária (HAAR; ACKERMAN, 1970). Com a expansão do mesoderma extraembrionário forma-se uma cavidade denominada celoma extraembrionário. Esta por sua vez, circunda todo o embrião e reduz o tamanho da cavidade do saco vitelino (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

Na posição caudal do embrioblasto desenvolve-se um divertículo mesodérmico (alantoide), angiogênico que se projeta em direção ao cone ectoplacentário para a subsequente formação da placenta corioalantoide. O referido pedúnculo alantoidiano originará o cordão umbilical (MESS; CARTER, 2007).

Oliveira (2004) caracteriza o cordão umbilical como um conjunto de vasos e ductos envolvidos no transporte de substâncias maternas necessárias ao desenvolvimento do feto. Ao descrever esta estrutura em mocós, mostrou que nesses animais o mesmo estava constituído por duas artérias, uma veia e o ducto alantoide, envoltos por uma substância de aspecto gelatinoso (geléia de Wharton). Além desses vasos observou-se a presença de uma artéria e uma veia vitelina, distribuídas ao longo da membrana coriovitelínica.

Em artigo de revisão, Jollie (1986) realizou descrições detalhadas acerca dos aspectos histológicos e ultraestruturais do saco vitelino de roedores. Nesse estudo, foi retratada a cavidade do saco vitelino delimitada pelos endodermas parietal e visceral. Em embriões de ratos com 18 dias de gestação, foram observadas pronunciadas vilosidades do endoderma visceral direcionadas para o endoderma parietal localizado na superfície da placenta corioalantoide. Com isso, uma rota de absorção era estabelecida, pois substâncias presentes nos canais de sangue materno do labirinto placentário poderiam atravessar a membrana de Reichert, endoderma parietal e alcançarem os vasos vitelinos do endoderma visceral para, em seguida, chegarem ao embrião.

Os mecanismos absortivos e alterações estruturais do endoderma visceral de camundongos foram analisados por Schlüter (1978) após injeção subcutânea de azul de trypan no organismo materno. Postulou-se que este corante vital inativava enzimas líticas, capazes de digerirem substâncias oriundas da mãe para a posterior transferência ao embrião. Para efeito de comparação, células endodérmicas viscerais de animais nos quais não se administrou o

referido corante, foram utilizados como controle do experimento. Através da microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas modificações estruturais nas células endodérmicas viscerais 12 horas após a administração do azul de trypan. Grande vacúolo único contendo matriz clara e gotículas escuras puderam ser evidenciadas na posição apical do citoplasma das células estudadas. Após 24 horas, grandes áreas citoplasmáticas apresentaram indícios de autodigestão e restos de organelas celulares. O autor pode concluir que as alterações morfológicas promovidas pelo corante poderiam causar efeitos teratogênicos ao embrião, mediado pelas células endodérmicas do saco vitelino invertido.

Fischer e Floyd (1972) desenvolveram trabalho de placentação utilizando o esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), avaliados do décimo terceiro dia até o final da gestação. Através de processamentos histológicos e microscopia de luz, os autores puderam destacar que entre os dias 15 e 16 de gestação, uma placenta corioalantoide apresentava desenvolvimento e expansão do labirinto. Nesse mesmo período, uma rápida proliferação de células endodérmicas parietais e membrana de Reichert ocorriam tanto na superfície da placenta principal quanto na camada de endoderma parietal que circunscrevia todo o embrião. A partir do vigésimo terceiro dia de gestação verificou-se ruptura da camada de endoderma parietal associada ao trofoblasto mural, restando um endoderma visceral em aposição ao útero, caracterizando a inversão total do saco vitelino nesta espécie.

À medida que o embrião encontra-se em desenvolvimento, ocorre uma inversão das camadas germinativas do disco embrionário e uma inversão do saco vitelino. A primeira situação ocorre pela transição da massa celular interna para disco embrionário. Virtualmente, o hipoblasto embrionário passa a ocupar a posição do epiblasto embrionário quando ocorre a cavitação para origem da cavidade amniótica (JOLLIE, 1990).

De acordo com Mossman (1987) a inversão do saco vitelino constitui a característica mais marcante que ocorre nas membranas fetais dos roedores. As células endodérmicas extraembrionárias do saco vitelino passam a formar uma interface com o tecido materno com uma orientação oposta à futura placenta corioalantoide. Consequentemente, o desenvolvimento de uma placenta vitelina invertida ocorrerá apenas em espécies nas quais exista a persistência do saco vitelino ao longo da gestação.

Uma forma primitiva de inversão pode ser encontrada em lagomorfos, insetívora e alguns morcegos. No entanto, os roedores desenvolveram uma forma extrema de sistema de

membranas, aptas aos processos absortivos, pela presença de uma placenta vitelina invertida ao mesmo tempo em que uma placenta principal encontra-se em formação. Quando a onfalopleura bilaminar persiste até o parto, a inversão é referida como incompleta (MOSSMAN, 1987).

Muitas vezes existem falhas no desenvolvimento pleno do saco vitelino parietal, degeneração do trofoblasto mural em contato com a decídua capsular correspondente ou deficiência na estrutura trofoblástica até mesmo no momento da implantação. Em todos os casos culmina-se com a ruptura da onfalopleura bilaminar. Consequentemente, o epitélio endodérmico visceral torna-se completamente exposto a luz uterina e a todo o seu conteúdo. Tal situação remete a condição de inversão total do saco vitelino (JOLLIE, 1990).

As células endodérmicas viscerais podem absorver várias substâncias presentes na luz uterina, muitas delas podendo chegar ao feto por transferência seletiva. A passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto representa um exemplo disso. O epitélio vitelínico pode constituir também uma barreira seletiva entre o compartimento uterino e fetal, evidenciados em muitos estudos que analisam a estrutura fina dessas células (KING, 1982).

Para Anderson (1959) a inversão do saco vitelino se processa quando a decídua capsular perde porções de células estromais até serem diluídas completamente. Posteriormente, desaparece a parede parietal do saco vitelino e as células do trofoblasto mural. As células do endoderma visceral apresentam aspecto colunar alto e as vilosidades dessa esplancnopleura aumentam em número e tamanho.

Lambson (1966) realizou um estudo que visava à identificação da rota de absorção, armazenamento e eliminação de ferritina exógena administrada em ratas Sprague-Dawley gestantes. Para tanto, desenvolveu uma minuciosa análise da estrutura fina do saco vitelino através de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Observou que aos dezesseis dias de gestação a organização estrutural do saco vitelino estava composta de uma monocamada de células endodérmicas parietais sustentadas por uma membrana basal de Reichert. Após o trofoblasto mural, podia ser evidenciada a decídua capsular, em seguida a luz e epitélio uterino. O epitélio endodérmico visceral encontrava-se apoiado por uma membrana basal que por sua vez era sustentado por uma fina capa fibrosa. Em seguida uma membrana basal serosa separava as estruturas citadas das células mesoteliais que faceavam o celoma extraembrionário. Após o referido período gestacional, ocorria a ruptura da decídua

capsular bem como da onfalopleura bilaminar, caracterizando a inversão total do saco vitelino. Assim, o endoderma visceral tornava-se exposto ao conteúdo uterino e mostrava-se cada vez mais propício a absorção da ferritina.

Estudando o processo de inversão do saco vitelino em três espécies de roedores, Miglino et al. (2008) evidenciaram várias características do saco vitelino e sua associação com a placenta corioalantoide. Utilizaram-se colorações de rotina como hematoxilina-eosina para a análise microscópica de luz e procedimentos usuais para microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a inversão ocorria na gestação inicial com o epitélio vitelínico visceral adjacente ao endométrio. No entanto, na gestação avançada, as três espécies diferiram. As amostras de paca e cutia apresentaram a presença de uma cápsula, constituída por decídua da zona juncional, envolvendo a placenta corioalantoide. Com relação ao preá, tal estrutura fibrosa não foi observada. A presença da cápsula impedia uma associação entre o saco vitelino visceral e a placenta corioalantoide. As vilosidades nas células endodérmicas eram mais proeminentes nas regiões próximas a placenta principal. No preá, as células da endoderme visceral apresentavam conformação colunar e atividade secretora, sugerida pela presença de vacúolos e partículas eletrodensas.

Conceição et al. (2008) promoveram caracterizações morfológicas do saco vitelino de cutias e pacas baseando-se nos dados macroscópicos, microscopia óptica e eletrônica. Detectaram a presença da membrana de Reichert (apoiando o endoderma parietal) em pacas e a total ausência em cutias. Em todas as amostras analisadas, o saco vitelino apresentou-se invertido e vascularizado. Com relação aos dados ultraestruturais, relatou-se que o epitélio endodérmico visceral caracterizava-se pela presença de células com núcleos dispostos na posição apical em cutias e mediana em pacas. Neste último foi possível evidenciar um único nucléolo bem definido. O citoplasma em ambas as espécies mostrou-se volumoso com cisternas do retículo endoplasmático bem desenvolvidas. Várias vesículas eletrodensas foram localizadas na região supranuclear bem como a presença de grande quantidade de micro vilosidades na face voltada para a parede uterina.

Roedores do velho mundo da espécie *Petromus typicus* tornaram-se alvo de pesquisas referentes à placentação corioalantoide e vitelínica com o intuito de se evidenciar o desenvolvimento dos anexos fetais e tecidos maternos ao longo da gestação. As estruturas placentárias foram investigadas por microscopia de luz convencional além da eletrônica. Os

resultados demonstraram que na gestação inicial uma imatura placenta corioalantoide estava presente no lado mesometrial do útero. Uma camada de endoderma parietal foi retratada e encontrava-se apoiada na membrana de Reichet cobrindo a superfície da placenta principal. A esplancnopleura visceral entrava em contato com o epitélio uterino resultando em um aspecto completamente invertido. Na gestação intermediária, próxima a placenta principal, um saco vitelino invertido mostrou-se altamente dobrado, com vilosidades em aposição ao endoderma parietal. As células viscerais apresentaram figuras mitóticas, inclusões citoplasmáticas densas inferindo-se capacidade de absorção e captação de substâncias presentes no epitélio uterino. A gestação avançada revelou a perda da estreita associação do epitélio visceral com o útero, porém, as inclusões densas permaneciam (MESS, 2007).

Carpenter e Ferm (1969) investigaram a capacidade de captação e armazenamento de uma substância particulada e metabolicamente inerte (thorotrast) pelo saco vitelino visceral de conceptos de hamsters (*Cricetus auratus*). Para atingir tal objetivo, utilizaram técnicas de microscopia óptica, eletrônica e ensaios imunohistoquímicos após administração do thorotrast. Em seguida, acompanharam todos os aspectos estruturais apresentados pelo epitélio visceral. Tal pesquisa revelou aspectos interessantes relacionados à inversão do saco vitelino. Os autores estabeleceram para a espécie estudada um período gestacional de dezesseis dias e caracterizaram a placenta vitelínica como completamente invertida. A degeneração da onfalopleura bilaminar ocorreu tardiamente, por volta do décimo terceiro dia de gestação. Tal fenômeno biológico possibilitou à exposição do endoderma visceral as substâncias secretadas pelo útero. A expansão do saco amniótico e ainda o constante crescimento fetal possibilitaram uma estreita aproximação entre a placenta vitelínica visceral e o epitélio uterino. Após a inversão, o saco vitelino visceral apresentou-se constituído por três camadas. A primeira caracterizou-se por conter células endodérmicas de aspecto colunar alto com citoplasma abundante e núcleo situado na posição basal da célula. Em seguida, uma segunda camada constituída por tecido conectivo mesenquimal continha vasos vitelínicos. Finalmente foi evidenciada uma camada de células mesoteliais achatadas, delimitando a cavidade do celoma extraembrionário. A primeira camada separava-se da segunda por uma membrana basal visceral, enquanto a segunda repousava sobre uma membrana serosa, separando-se da terceira camada. O referido endoderma visceral apresentou vilosidades mais proeminentes nas regiões próximas à placenta corioalantoide.

Apesar das principais informações sobre transferência de nutrientes via placenta vitelina, estarem relacionadas ao saco vitelino visceral, deve-se ressaltar também o papel do endoderma parietal na absorção de muitas substâncias.

Jollie (1968) realizou estudo sobre mudanças na estrutura fina da placenta parietal de ratas com o aumento da idade gestacional. O primeiro grupo de fêmeas gestantes foi utilizado na descrição da placenta vitelina parietal de 12 até 22 dias de gestação. No segundo grupo, foram injetados ferritina e thorotrast com o intuito de evidenciar os aspectos absortivos do epitélio endodérmico. Todo o material foi analisado com o auxilio da microscopia eletrônica. Posteriormente, o autor argumenta que para alcançar a circulação vitelínica, nutrientes presentes no sangue materno devem atravessar o trofoblasto mural, membrana de Reichert e endoderma parietal para em seguida, atingirem os vasos vitelínicos do epitélio visceral. No entanto, a partir do décimo sexto dia de gestação ocorria ruptura da membrana de Reichert seguida de retrações do trofoblasto, endoderma parietal e decídua capsular. Estabelecer-se-ia uma inversão total do saco vitelino com as cavidades vitelínicas e uterinas se apresentando confluentes. Assim, a placenta parietal remanescente que permanecia até o final da gestação era aquela que se localizava na superfície da placenta corioalantoide.

Em roedores histricomorfos a inversão completa do saco vitelino é decorrente de falhas no desenvolvimento do endoderma parietal. Nos miomorfos a onfalopleura bilaminar desaparece precocemente (MOSMAN, 1987). O porquinho da Índia perde sua parede parietal logo após a implantação, sendo a decídua capsular rompida por volta do trigésimo dia de gestação (JOLLIE, 1990).

De acordo com Enders e Blankenship (1999), ocorrem processos degenerativos da parede parietal do saco vitelino no décimo quinto dia de gestação em camundongos. Consequentemente, a superfície apical do epitélio visceral torna-se exposta aos produtos secretórios das glândulas uterinas. Os capilares endometriais mostram-se aparentes nas proximidades do epitélio uterino, podendo fornecer nutrientes maternos para o feto. Por conseguinte, pode haver transferência de imunoglobulinas protetoras via placenta vitelina invertida na gestação avançada.

3.4 FUNÇÕES DO SACO VITELINO NOS VERTEBRADOS

O mesoderma extraembrionário do saco vitelino visceral caracteriza-se por representar o primeiro local para a origem dos vasos vitelínicos e também de células hematopoiéticas. O desenvolvimento de eritrócitos é acompanhado pela produção de estruturas proteicas cuja conformação espacial produzirá hemoglobinas capazes de transportar o oxigênio. Nesta membrana fetal desenvolvem-se também células linfóides e da linhagem mielóide (JOLLIE, 1990).

Com o intuito de evidenciar essas funções, Haar e Ackerman (1970) realizaram estudos de microscopia eletrônica enfatizando os processos de vasculogênese e eritropoiese promovidos pelo saco vitelino visceral de camundongos CBA obtidos entre sete e onze dias de gestação. Para atingir tal objetivo, foram coletados úteros contendo sacos gestacionais fixados rapidamente em glutaraldeído tamponado com solução fosfato 0,1 M em pH 7,4. Posteriormente dissecou-se o saco vitelino visceral de cada amostra para pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% tamponado em pH 7,4. Em seguida o material de interesse foi embebido em epon 812 e seccionado com o auxilio de um ultramicrótomo para posterior visualização em microscópio eletrônico. De posse dos resultados, os autores afirmaram que durante o desenvolvimento embrionário formava-se uma camada de mesoderma abaixo da membrana basal que sustentava o endoderma visceral. Em determinadas áreas ocorriam proliferações de células mesodérmicas originando massas celulares denominadas cordões angioblásticos. Já a única camada de células do mesoderma voltada em direção ao celoma extraembrionário transformava-se em células mesoteliais. Consequentemente, os cordões angioblásticos encontravam-se separados do endoderma visceral por uma incompleta membrana basal e do mesotélio, por uma membrana basal serosa. Algumas células da periferia dos cordões angioblásticos proliferavam e se diferenciavam em células endoteliais produzindo a vascularização do saco vitelino. Já as células remanescentes se diferenciavam em primitivos eritroblastos iniciando a formação das hemácias.

Em relação à origem de precursores imunocíticos (linfócitos) no saco vitelino visceral, Haar (1977) desenvolveu um estudo *in vitro* cultivando 14 sacos vitelínicos provenientes de camundongos CBA/J aos nove dias de gestação. Para tanto, cultivou tais amostras em meio

mínimo essencial (MEM) suplementado com soro humano a 10% por três dias. Após isto, as amostras foram removidas e fixadas em glutaraldeído a 3% acrescido de tampão fosfato 0,1 M em pH 7,3. Em seguida, utilizou-se o tetróxido de ósmio para pós-fixação sendo realizados cortes muito finos com o auxílio de um ultramicrótomo. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo para posterior estudo em microscópio eletrônico. Os resultados revelaram células endodérmicas viscerais dotadas de numerosas microvilosidades, vesículas de pinocitose, complexo de Golgi e mitocôndrias. Esse endoderma visceral encontrava-se separado do mesoderma subjacente por uma membrana basal. Em determinados locais do mesoderma observaram-se espaços delimitados por endotélio formando a luz dos vasos vitelínicos. Nestes locais, foram identificados precursores de hemácias (eritroblastos basofílicos) e de linfócitos. Posteriormente, concluiu-se que o saco vitelino visceral originava linfócitos em diferentes estágios de maturação e ainda que a presença dessas células em amostras *in vivo* era pouco frequente, devido ao fato de que nesta última condição, os precursores linfocíticos podiam migrar rapidamente para o fígado e timo no organismo fetal.

Do ponto de vista dos aspectos absortivos observa-se também que as células endodérmicas do saco vitelino em roedores encontram-se expostas a luz uterina e consequentemente aos seus produtos secretórios. Estas células podem absorver uma variedade de substâncias, armazená-las e transferi-las ao feto. Tanto o endoderma parietal quanto o visceral podem conferir uma barreira seletiva entre os compartimentos uterino e fetal através da manutenção de gradientes iônicos e osmóticos (KING, 1982).

Em experimentos realizados por Chan e Wonh (1978), demonstrou-se um mecanismo de transporte ativo de sódio situado nas células endodérmicas viscerais em embriões de ratos Wistar do dia 17 a 21 de gestação. Ensaios *in vitro* utilizando câmaras especialmente construídas para medidas de correntes de circuito curtas e diferença de potencial transepitelial, tornaram possíveis os rastreamentos do fluxo de sódio bidirecional, favorecido no sentido de mãe para feto. Neste estudo, afirmou-se ainda que o transporte ativo de sódio através do epitélio visceral contribuiu para a formação do líquido amniótico.

Antes do estabelecimento de uma circulação vitelínica em conceptos de ratos, o endoderma visceral pode fornecer nutrientes para o embrião através do processo de difusão. Após esse período, por volta do décimo dia pós-implantação, células endodérmicas viscerais podem absorver proteínas presentes nas proximidades do local da implantação através da

formação de vesículas de pinocitose. As moléculas protéicas captadas podem sofrer ação de enzimas lisossômicas resultando na formação de aminoácidos que podem ser fornecidos ao embrião. Estudos prévios baseados nessa afirmativa revelaram que o saco vitelino visceral podia transmitir aminoácidos necessários ao desenvolvimento embrionário em ratos Wistar entre 9,5 e 11,5 dias pós-implantação ao serem cultivados *in vitro* (BECKMAN et al., 1996).

O saco vitelino pode atuar como um órgão placentário na medida em que participa das trocas fisiológicas entre mãe e feto. De fato, essa membrana fetal contribui para o crescimento do concepto fornecendo componentes vitais para o desenvolvimento deste último. Além disso, o saco vitelino participa da biossíntese e metabolismo de substâncias necessárias ao embrião (FREYER; RENFREE, 2009).

A transferência de imunoglobulinas da classe IgG do organismo materno para o fetal em primatas ocorre principalmente no período gestacional, via placenta corioalantoide. Em roedores, tal transferência de imunidade passiva ocorre na gestação inicial a partir da captação desses anticorpos pelas células endodérmicas do saco vitelino invertido. Após o nascimento, ratos e camundongos obtêm as imunoglobulinas G pelo leite materno. Em coelhos e no porquinho da Índia a passagem de anticorpos da mãe para o feto é significativa no período pré-natal devido à ação do saco vitelino invertido (PENTŠUK; VAN DER LAAN, 2009).

Existem evidências em roedores que o endoderma visceral possui capacidade de sintetizar colesterol conferindo matéria prima para a produção de hormônios esteroides e desenvolvimento de membranas citoplasmáticas nesse epitélio (WOOLLETT, 2005). Foi demonstrada em ratos a síntese de proteínas séricas como albumina e alfafetoproteína pelo endoderma do saco vitelino visceral (NAHON et al., 1987).

Plonné et al. (1992) desenvolveram estudos visando a detecção da capacidade de síntese de lipoproteínas pelo endoderma visceral de ratos Wistar com 22 dias de gestação. Utilizaram-se técnicas de microscopia eletrônica e imunocitoquímicas para confirmar tal hipótese. No ensaio imunocitoquímico, utilizou-se a L-[^{35}S] metionina como componente radioativo com capacidade de incorporação a apolipoproteína B. Para a precipitação desta última, adicionou-se proteína A insolúvel de *Staphylococcus aureus* seguida da incubação com anticorpo anti-apoB obtido em coelhos. Os resultados revelaram nas células do endoderma visceral a presença de complexos de Golgi, retículos endoplasmáticos e vesículas

secretórias contendo partículas de apolipoproteína B que posteriormente eram transferidas ao embrião.

Ressalta-se também que o epitélio endodérmico vitelínico de mamíferos pode expressar fatores de crescimento e de transcrição bem como receptores para proteínas que controlam as funções do saco vitelino e ainda a consequente diferenciação dessas células (FREYER; RENFREE, 2009).

As inúmeras possibilidades de estudos relacionados a este anexo fetal produziram, ao longo dos últimos anos, diversos trabalhos relacionados à função do saco vitelino (JOLLIE, 1968; HAAR, 1977; KING, 1982; NAHON et al., 1987; JOLLIE, 1990; WOOLLETT, 2005; FREYER; RENFREE, 2009; PENTŠUK; VAN DER LAAN, 2009). De fato, diante das muitas e diversificadas funções, considera-se importante os conhecimentos sobre os aspectos anatômicos, fisiológicos, imunológicos e caracterizações das células que compõe este epitélio. Tais informações podem evidenciar mecanismos de injúria fetal, distúrbios metabólicos mediados por agentes teratogênicos e contribuições científicas nas áreas de farmacologia e biologia celular e molecular. Células pluripotentes, formadas pelo epitélio endodérmico, podem conferir material genético considerável para as pesquisas envolvendo transplante de células tronco e desta forma, contribuírem para o desenvolvimento de novas terapias gênicas.

Acredita-se que o processo de inversão do saco vitelino encontra-se correlacionado ao desempenho das várias funções previamente citadas. Ao mesmo tempo, tal condição caracteriza um paradigma, pelo fato do trofoblasto mural sofrer degeneração durante a inversão, sendo que estas células estariam associadas à conferência de proteção imunológica ao feto contra possíveis anticorpos produzidos pelo organismo materno. Por este motivo, muitos destes mecanismos carecem de maiores esclarecimentos e fazem com que os estudiosos desta área utilizem o termo inversão como característica enigmática do saco vitelino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material destinado à realização de estudo sobre a inversão do saco vitelino em preá foi obtido no CEMAS (Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA), registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912, criado em 12 de setembro de 1989 através da portaria ESAM N° 154/89. Ocupa uma área de 20 ha e localiza-se entre as coordenadas geográficas 5° 11’S e 37° 20’W Gr, com altitude ao redor de 16m acima do nível do mar. Tem como objetivo fomentar pesquisas, conservação e manutenção de espécies silvestres criadas em cativeiro, bem como criar tecnologia capaz de produzir proteína animal de baixo custo para populações de baixa renda.

Em seu organograma, o Centro de Multiplicação de Animais Silvestres, encontra-se dividido em setores distintos, onde são desenvolvidos projetos de pesquisas referentes ao manejo de espécies silvestres, dentre elas o preá.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

Os preás são roedores de médio porte (BONVICINO et al., 2008), sendo menores do que as cutias e maiores do que os roedores sigmodontíneos (PERCEQUILLO et al., 2007). Possuem pelagem densa e híspida com a região dorsal de coloração ligeiramente cinza e região ventral branca (BONVICINO et al., 2008). O crânio apresenta um forâmen infraorbital grande além de dentes incisivos largos, um pré-molar e três molares (PERCEQUILLO et al., 2007).

Nestes animais predominam os hábitos terrestres e diurnos, sendo sua presença associada à vegetação de caatinga baixa além de áreas do cerrado brasileiro (BONVICINO et al., 2008).

A classificação taxonômica do preá (figura 1) pode ser demonstrada de acordo com Wilson e Reeder (2005) que por sua vez, descreveu da seguinte forma:

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Mammalia

Infraclasse Placentalia

Ordem Rodentia

Subordem Hystricomorpha

Família Caviidae

Gênero Galea

Espécie *Galea spixii* Wagler, 1831.

Figura 1 – Exemplar de *Galea spixii* utilizado no experimento. Centro de Multiplicação de Animais Silvestres- UFERSA/RN.

Fonte: Acervo do pesquisador.

4.2 ANIMAIS AMOSTRADOS

Selecionou-se 30 fêmeas de preás não gestantes para a formação de seis grupos experimentais contendo cinco fêmeas cada. Os animais foram alocados em boxes de $5m^2$ nos quais foi fornecido ração para roedores, frutos, grãos de soja, milho e água *ad libitum*. A diferenciação das fêmeas em cada grupo foi feita pela pintura com tintura capilar negra (Velaton® - Phitoterapia Biotogenia Laboratorial Ltda), em diferentes posições anatômicas, realizadas na seguinte ordem: região torácica direita (fêmea um), torácica esquerda (fêmea dois), região pélvica direita (fêmea três), pélvica esquerda (fêmea quatro) e dorsal (fêmea cinco).

Posteriormente, foram adicionados em cada grupo um macho, sendo a cópula detectada pela pesquisa de espermatozoides na citologia vaginal (figura 3); onde a presença dos gametas masculinos estabeleceu o início do período gestacional após vinte e quatro horas. Após isto, duas fêmeas de cada grupo foram acompanhadas para a definição do período gestacional nesta espécie, onde se encontrou uma média de 57,3 dias com desvio padrão de 2,6 dias. As outras fêmeas de cada grupo (n=3) foram utilizadas na coleta de estruturas maternas e fetais de interesse para o trabalho.

4.3 CITOLOGIA VAGINAL

Os esfregaços vaginais foram confeccionados coletando-se fluido vaginal com o auxílio de um swab estéril embebido previamente em solução salina a 0,9%. Esse procedimento foi realizado diariamente, no período das 6:00 às 7:00 horas da manhã de forma a garantir uniformidade no estabelecimento do primeiro dia de gestação. O material coletado foi distendido em lâmina de vidro e deixado à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, realizaram-se colorações utilizando corante panótico rápido Instant-Prov (New Prov®) de acordo com as recomendações preconizadas pelo fabricante. As amostras positivas para células espermáticas (Figura 2) culminaram com a separação da respectiva fêmea do box

na qual a mesma se encontrava, evitando desta forma, o estresse gerado pela coleta e ainda o contato com o macho.

Figura 2 – Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerou-se o primeiro dia de gestação. Objetiva de 40X. Barra = 92 µm. Coloração panótica rápida.

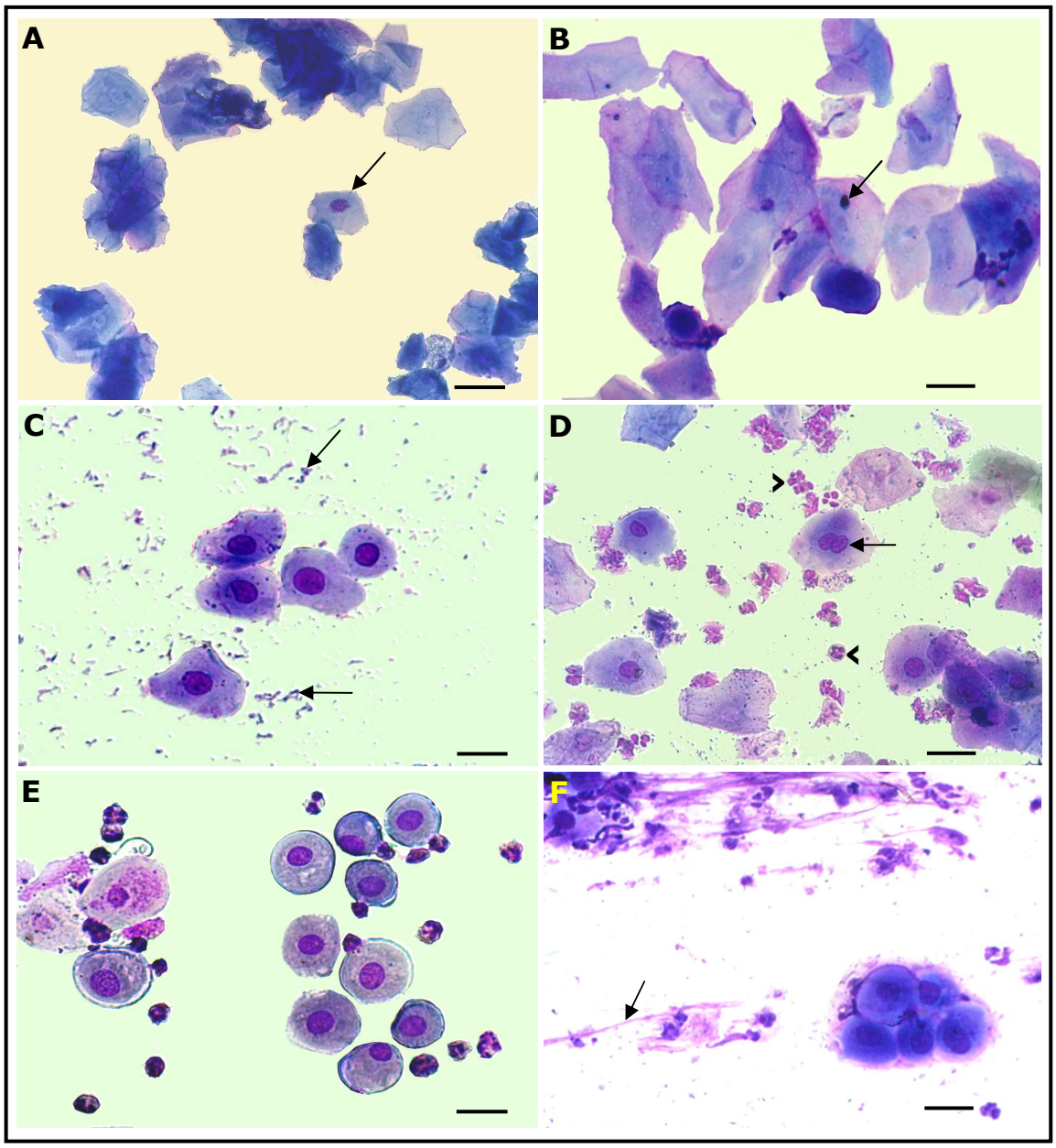
Fonte: Acervo do pesquisador.

Adicionalmente, foram caracterizadas as células do epitélio vaginal de acordo com os padrões celulares predominantes em cada fase do ciclo estral (Figura 3). Durante o proestro, ocorreu predominância de células superficiais anucleadas, seguidas de regular quantidade de células intermediárias e pequena quantidade de parabasais e superficiais nucleadas. Já na fase de estro, observaram-se numerosas células superficiais anucleadas, moderada quantidade de intermediárias e superficiais nucleadas, sendo raras as células profundas (parabasal e basal) e os neutrófilos segmentados.

Posteriormente, na fase de metaestro, evidenciou-se grande quantidade de neutrófilos, bacilos e células intermediárias, seguidas de regular quantidade de superficiais anucleadas e parabasais, além de poucas células basais. O diestro caracterizou-se pela presença de células

profundas, sendo encontrada também regular quantidade de leucócitos, filamentos de muco vaginal e poucas células intermediárias.

Figura 3 – Fases do ciclo estral em preás. Em A: Proestro. Observam-se uma célula intermediária (seta) e as demais, superficiais anucleadas com formato poligonal. Barra = 85 µm. Em B: Estro. Muitas células superficiais anucleadas poligonais e uma com núcleo picnótico (seta). Barra = 91 µm. Em C: início do metaestro. Aumento do número de células intermediárias poligonais apresentando núcleos com cromatina finamente granular. Notar a numerosa microbiota bacilar (setas). Barra = 93 µm. Em D: Fase intermediária do metaestro. Observar o predomínio de células intermediárias, uma delas binucleada (seta) e neutrófilos (cabeças de seta). Barra = 92 µm. Em E: Início do diestro. Predomínio de células parabasais redondas e regular quantidade de leucócitos. Barra = 91 µm. Em F: Final do diestro representada por células basais redondas (descamadas de forma agrupada), e filamentos de muco vaginal (seta). Barra = 91 µm. Figuras de A até F: Coloração panótica rápida.



Fonte: Acervo do pesquisador.

4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO

Os animais foram pesados e posteriormente pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina (1mg. Kg $^{-1}$) e cloridrato de cetamina (15mg. kg $^{-1}$) por via intramuscular. Após 10 minutos, a eutanásia foi realizada através de sobredose anestésica utilizando-se o tiopental (150mg. kg $^{-1}$) seguida da administração de cloreto de potássio 2,56 mEq. Kg $^{-1}$ambos por via intravenosa. Constatada a morte do animal, realizou-se uma incisão longitudinal mediana, de forma a expor o útero gravídico, identificando o corno uterino gestante e coletando-se os sacos gestacionais.

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise macroscópica foi realizada utilizando-se duas fêmeas no final da gestação com o intuito de evidenciar em destaque o útero, feto e membranas fetais. Na primeira fêmea injetou-se na artéria uterina, látex Neopreme 650 centrifugado de cor branca e na veia uterina, látex de cor azul, seguido da fixação em formaldeído a 10%. Posteriormente, dissecou-se o útero gravídico para expor o feto e membranas fetais, realizando-se em seguida, fotografias das principais estruturas materno fetais. Para a coleta do segundo animal, optou-se pela obtenção das amostras a fresco e procedeu-se como para o primeiro animal.

4.6 DETECÇÃO DA INVERSÃO

A detecção da inversão do saco vitelino e ainda a definição do período em que ocorre foram trabalhados de forma coordenada e retroativa iniciando com uma coleta de um saco gestacional de 30 dias. Detectada a inversão, programaram-se as coletas subsequentes nos dias 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 e seis de gestação até que se fosse evidenciada uma

disposição de membranas fetais em situação anterior a inversão. Após tal achado, foi possível estabelecer o dia em que ocorre a inversão do epitélio vitelínico, utilizando-se para este fim metodologia preconizada para análises microscópicas, descritas a seguir.

4.7 MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

O processamento histológico foi realizado no laboratório de histologia da Faculdade de Medicina Veterinária e no núcleo de pesquisa do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), ambos situados na UFERSA, sendo a metodologia empregada baseada em técnicas de histologia preconizadas por Tolosa et al. (2003) com adaptações em função da natureza do material.

Para desenvolvimento desta etapa foram processados os sacos gestacionais inteiros de modo que fossem mantidas as relações de justaposição entre as membranas extraembrionárias, facilitando à identificação dos elementos necessários a caracterização da inversão do saco vitelino. Os sacos gestacionais foram acondicionados em frascos contendo paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 durante 24 horas. Completada a fixação, o material foi colocado em álcool 50% “over night” e em seguida, transferido para uma série de concentrações crescentes de álcoois (60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), por uma hora cada. A diafanização foi obtida pela utilização de dois banhos de xilol com duração de uma hora cada. Na parafinização, os materiais foram submetidos a três banhos de parafina histológica (Synt®, granulada com ponto de fusão 58ºC a 62ºC, lote: 138199), com intervalo de permanência em cada banho de uma hora. Completada a parafinização, o material foi incluído em uma nova parafina a 58ºC para obtenção dos blocos e consequente produção dos cortes com espessura de cinco micrômetros em micrótomo (LEICA RM 2125 RT®). Os cortes eram então aderidos em lâminas de vidro e deixados em estufa a 60ºC “over night”. Posteriormente, foram realizadas colorações das lâminas seguindo a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), azul de toluidina (AT), ácido periódico de Schiff (P.A.S) para análise em microscópio óptico (Olympus CX 31 RBSFA®) sendo as imagens analisadas e fotomicrografadas.

4.7.1 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Para os testes envolvendo reações imunohistoquímicas, optou-se pela reação do PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) na verificação da capacidade de proliferação das células endodérmicas viscerais e vimentina com o objetivo de evidenciar vasos vitelínicos deste epitélio. Ambas as reações basearam-se na detecção de moléculas específicas a partir de reações antígeno/anticorpo.

Os cortes do saco gestacional após serem aderidos em lâminas silanizadas foram imersos em concentrações decrescentes de etanol para posterior bloqueio da peroxidase endógena pela utilização de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. Após esta etapa, o material foi imerso em tampão citrato a 0,1 M e pH 6 e submetido a irradiações por micro-ondas a 700 MHz durante 15 minutos. Posteriormente, realizaram-se lavagens do material em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4 , sendo em seguida, adicionado proteína Dako para bloquear reações inespecíficas.

A reação do PCNA e vimentina foi evidenciada pela incubação do material com anticorpo monoclonal de camundongo anti-PCNA humano (PC 10, sc-56, diluição 1:800; Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-vimentina humano (V9, sc-6260, diluição 1:200; Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A) respectivamente em câmara úmida a 4ºC “overnight”. Desta forma, revelaram-se estas reações pela incubação com conjugado representado por anticorpo anti-camundongo de carneiro da classe G (AP308F) diluído 1:500 marcado com a biotina e posterior adição do complexo streptavidina HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A) e substrato cromogênico constituído por aminoetil carbazol (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, U.S.A).

4.8 MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As análises através da microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Histologia do Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Um saco gestacional de 30 dias, previamente fixado em glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4, foi cortado no sentido transversal e lavado com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4. Em seguida, realizou-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4, por duas horas. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão e duas, com água destilada. Subsequentemente, realizou-se tratamento com ácido tânico 1% e desidratação em série de álcoois com diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e 100%).

Finalizada a desidratação foi feita a secagem em aparelho de ponto crítico utilizando gás carbônico (CO_2). As seguintes etapas consistiram na montagem do material em suporte do ponto de amostra (Stub) e recobrimento metálico com ouro por “sputtring”, para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO VP® 435 – Carl-Zeis, Oberkochen, Germany), sendo as imagens mais representativas do saco vitelino eletromicrografadas.

4.9 MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para análise ultraestrutural da placenta vitelina de preás realizou-se coleta de uma fêmea aos 14 dias de gestação com o intuito de localizar a onfalopleura bilaminar e ainda caracterizar as células do endoderma visceral em diferentes regiões do saco gestacional. Com esta finalidade, buscou-se descrever a estrutura fina do epitélio visceral localizado tanto na região proximal da placenta corioalantoide quanto nos locais distantes da mesma. Este raciocínio serviu para evidenciar possíveis diferenças na distribuição das organelas citoplasmáticas, localizações de mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático rugoso, vesículas de pinocitose e partículas eletrodensas fazendo um comparativo com as regiões

analisadas. Tais informações possibilitaram inferir alguns aspectos funcionais do saco vitelino e ainda quais as consequências do processo de inversão deste epitélio.

O processamento inicial consistiu na imersão dos fragmentos do saco vitelino em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4 por um período de 24 horas, lavando-o, em seguida, com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 e posteriormente pós-fixando em tetróxido de ósmio tamponado com a solução tampão, por duas horas. Completada a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em solução tampão de fosfato de sódio por três vezes durante 10 minutos cada. Outra lavagem foi feita, desta vez, utilizando-se água destilada por 15 minutos. Para desidratação, o material foi imerso em concentrações crescentes de álcool etílico: 50%, 70%, 80%, 90% (15 minutos em cada álcool) e álcool etílico absoluto, realizando-se três trocas a cada 15 minutos.

Após a desidratação, o material foi submetido a duas lavagens com óxido de propileno por 10 minutos sob rotação e depois, imerso em mistura de óxido de propileno e resina Spurr na proporção 1:1 por seis horas e em seguida, colocados em resina Spurr pura por um período de 12 horas sob rotação. Finalmente, foram acondicionados em moldes específicos contendo resina, em estufa a 60ºC por 72 horas para polimerização.

Tal procedimento tornou possível a obtenção dos blocos nos quais foram obtidos cortes semifinos com 0,4 µm de espessura em ultramicrótomo automático (Ultracut R, Leica Microsystens, Germany). Estes cortes foram corados em azul de Toluidina a 1% para identificação das regiões específicas de interesse para o trabalho de forma a possibilitarem a realização dos cortes ultrafinos. Consequentemente, cortes de 0,07µm de espessura foram feitos e coletados em telas de cobre, além de contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,5% para a análise em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft Imaging, Germany). As imagens mais condizentes com os principais objetivos propostos foram eletromicrografadas e correlacionadas com outras metodologias utilizadas neste trabalho.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se apresentados de forma sequencial aos objetivos propostos de modo a garantir uma melhor compreensão das principais características do saco vitelino na espécie estudada e ainda o consequente processo de inversão deste anexo fetal.

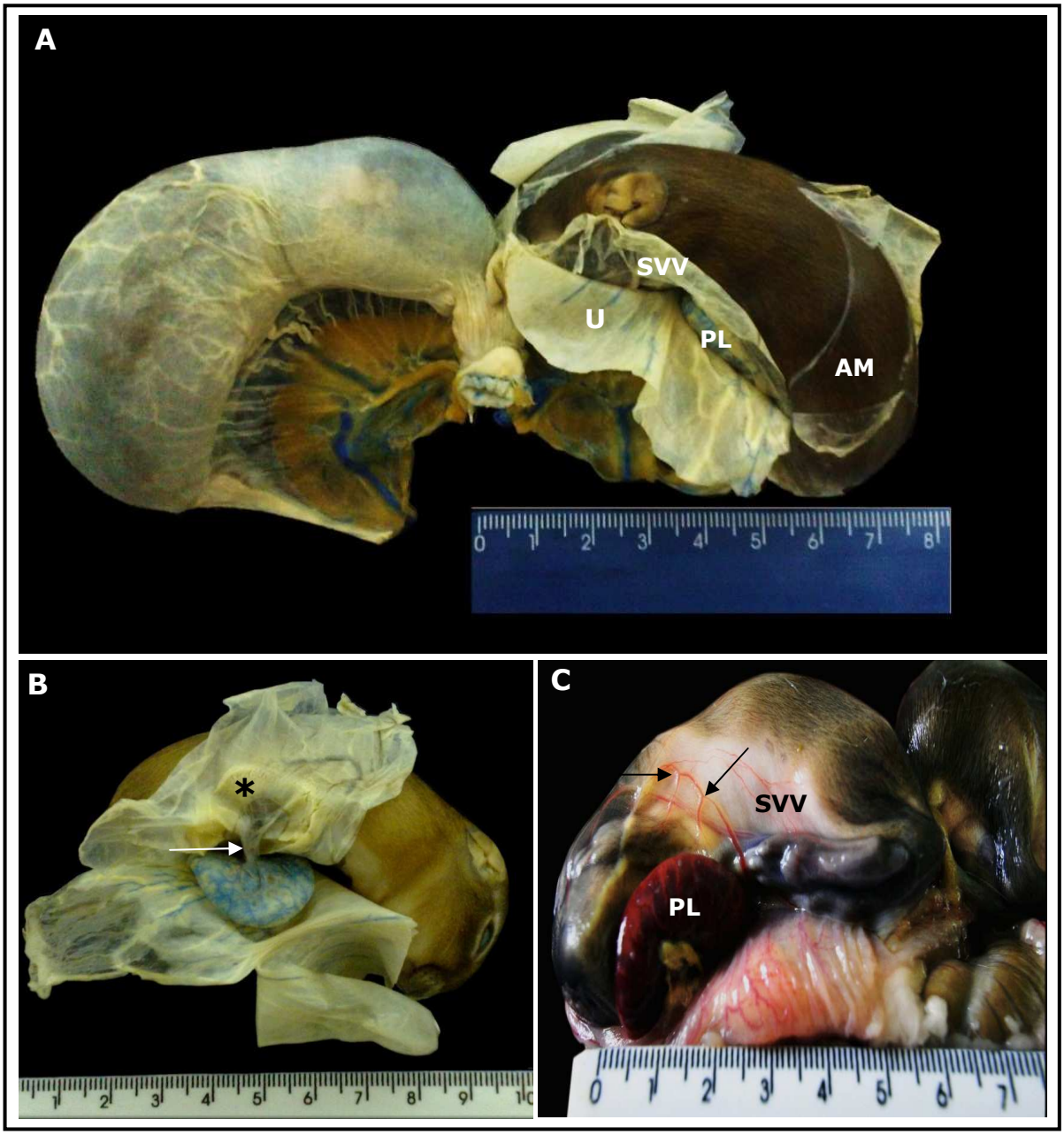
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SACO VITELINO

A descrição macroscópica do saco vitelínico foi obtida utilizando-se material fixado em solução aquosa de formaldeído a 10%, tendo sido previamente perfundido com látex neoprene 650 para melhor evidenciação das estruturas maternas, membranas fetais e placenta corioalantoide, bem como a fresco para visualização do aspecto natural da placenta vitelina.

O primeiro método garantiu maior resistência às membranas fetais e facilitou as dissecações. Desta forma, Foi possível caracterizar o saco vitelino como uma membrana que recobria todo o feto, mantendo íntima relação com o epitélio uterino. Este endoderma visceral apresentou-se vascularizado por artérias e veias vitelínicas dispostas lateralmente umas as outras provenientes de vasos que saiam do cordão umbilical. O âmnio envolvia o feto e revelou-se transparente, além de manter estreita relação com o endoderma visceral. Este último apresentou aspecto viloso, facilmente observado na região que margeava a placenta principal.

Em amostra obtida a fresco, o saco vitelínico apresentou-se delgado e transparente, permitindo que se observassem as ramificações da vascularização deste epitélio envolvidas no suprimento sanguíneo para o feto (Figura 4).

Figura 4 – Sacos gestacionais de preá a termo. Em A: evidencia-se a parede do útero (U), saco vitelino visceral (SVV), placenta corioalantoide (PL) e âmnio (AM). Observar a estreita relação que o saco vitelínico mantém com o útero, âmnio e placenta. Em B: evidencia-se o cordão umbilical (seta) promovendo conexão entre o feto e placenta corioalantoide. O saco vitelino visceral (SVV) apresentou aparência vilosa (*), principalmente nas regiões próximas a placenta principal. Em C: Destaca-se a placenta corioalantoide (PL) com a face convexa voltada para o feto e a côncava voltada para o epitélio uterino. Observar as delgadas ramificações da vascularização do saco vitelino visceral (SVV) envolvida no suprimento sanguíneo para o feto (setas). A e B: Amostras colhidas mediante perfusão com látex neoprene 650 centrifugado, seguida da fixação em formaldeído a 10 %. Em C: amostra colhida a fresco.



Fonte: Acervo do pesquisador.

5.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Para melhor caracterizar os componentes teciduais do saco vitelino, foram adicionados alguns resultados referentes ao desenvolvimento inicial do blastocisto, de modo a proporcionar informações a cerca da formação do hipoblasto e consequentemente dos endodermas visceral e parietal que compõem a cavidade do saco vitelino.

Em seguida, promoveram-se descrições do epitélio vitelínico e suas relações com outras membranas fetais, placenta corioalantoide e útero. É importante observar que alguns destes resultados obtidos com o auxílio da microscopia de luz foram associados com aqueles da microscopia eletrônica de varredura e transmissão dentro deste tópico de modo a integrar e ratificar o processo de inversão.

Esta última condição foi caracterizada em ordem cronológica abrangendo disposições de membranas fetais em situação anterior, durante e depois da inversão do saco vitelino. Posteriormente, outros achados relevantes para o presente trabalho foram apresentados em seus respectivos tópicos no tocante as técnicas de microscopia eletrônica.

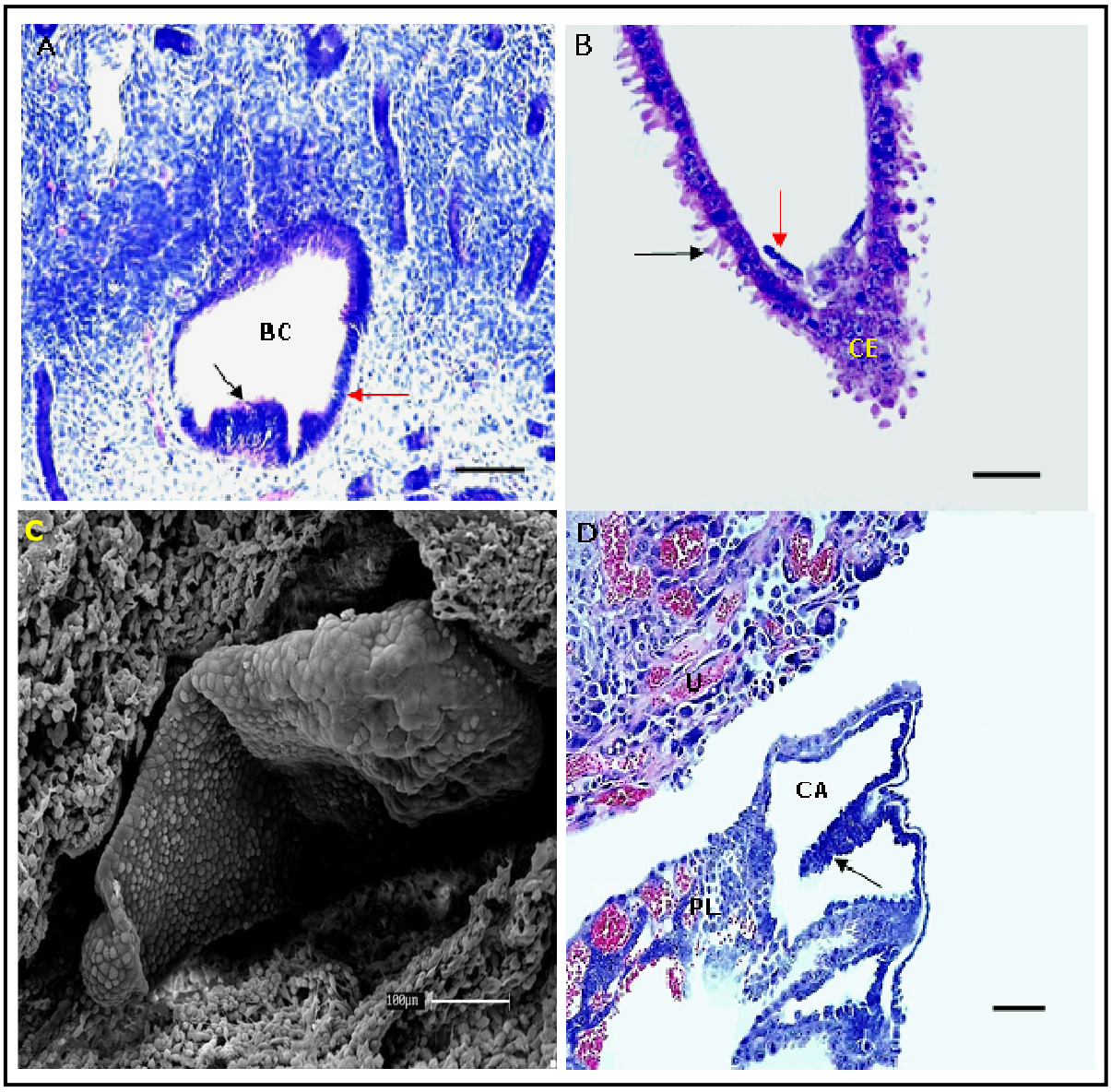
5.2.1 O BLASTOCISTO

O blastocisto aos seis dias de gestação apresentou forma arredondada ou oval, sendo seu revestimento externo constituído por trofoectoderma (ou trofoblasto mural) além de uma proeminente cavidade central reconhecida como blastocele. Num dos polos deste blastocisto, desenvolveram-se proliferações de células embrioblásticas (ou massa celular interna) constituindo os primórdios do embrião (Figura 5A).

A partir dos 10 dias de gestação, observou-se uma estrutura blastocística alongada ou cilíndrica com o revestimento interno composto por células hipoblásticas, delimitando a cavidade do saco vitelino. Neste período, evidenciaram-se também várias células do trofoectoderma, em localização oposta ao embrioblasto, multiplicando-se para a formação do cone ectoplacentário como observado na (Figura 5B).

A localização do blastocisto na luz uterina ocorreu na região mesometrial e sua implantação foi caracterizada como intersticial. Aos 12 dias de gestação, verificou-se a formação de uma proeminente cavidade amniótica constituída por células amnioblásticas que envolviam o embrioblasto. Gradualmente, foi observada a vascularização do cone ectoplacentário por vasos oriundos da alantoide, constituindo desta forma, uma primitiva placenta corioalantoide na região mesometrial do útero (Figura 5D).

Figura 5 – Desenvolvimento inicial do blastocisto em preás. Em A: Blastocisto aos seis dias de gestação. Observar a proliferação da massa celular interna ou embrioblasto (seta preta) em um dos polos do blastocisto, a blastocele (BC) e o revestimento externo do trofoectoderma (seta vermelha). Barra = 95 µm. Coloração Azul de toluidina. Em B: Blastocisto aos 10 dias de gestação. Notar as células trofoectodérmicas apresentando vilosidades (seta preta) e uma região de multiplicação e desenvolvimento do cone ectoplacentário (CE). Verifica-se também o início do revestimento interno da blastocele por células hipoblásticas (seta vermelha), delimitando a cavidade do saco vitelino. Barra = 91 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em C: Blastocisto aos 11 dias de gestação. Notar o formato alongado do blastocisto e sua localização na câmara de implantação. Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura. Em D: Blastocisto aos 12 dias de gestação. Visualizar a cavidade amniótica (CA) envolvendo a massa celular interna (MCI) (seta), o útero (U) e o surgimento de uma primitiva placenta corioalantoide (PL). Barra = 90 µm. Coloração Hematoxilina e eosina.



Fonte: Acervo do pesquisador.

5.2.2 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL ANTES DA INVERSÃO DO SACO VITELINO

No décimo segundo dia de gestação, evidenciou-se a placenta corioalantoide, ainda desorganizada estruturalmente e apresentando muitas áreas de sangue materno, além do pedúnculo placentário que inseria a placenta no estroma decidualizado.

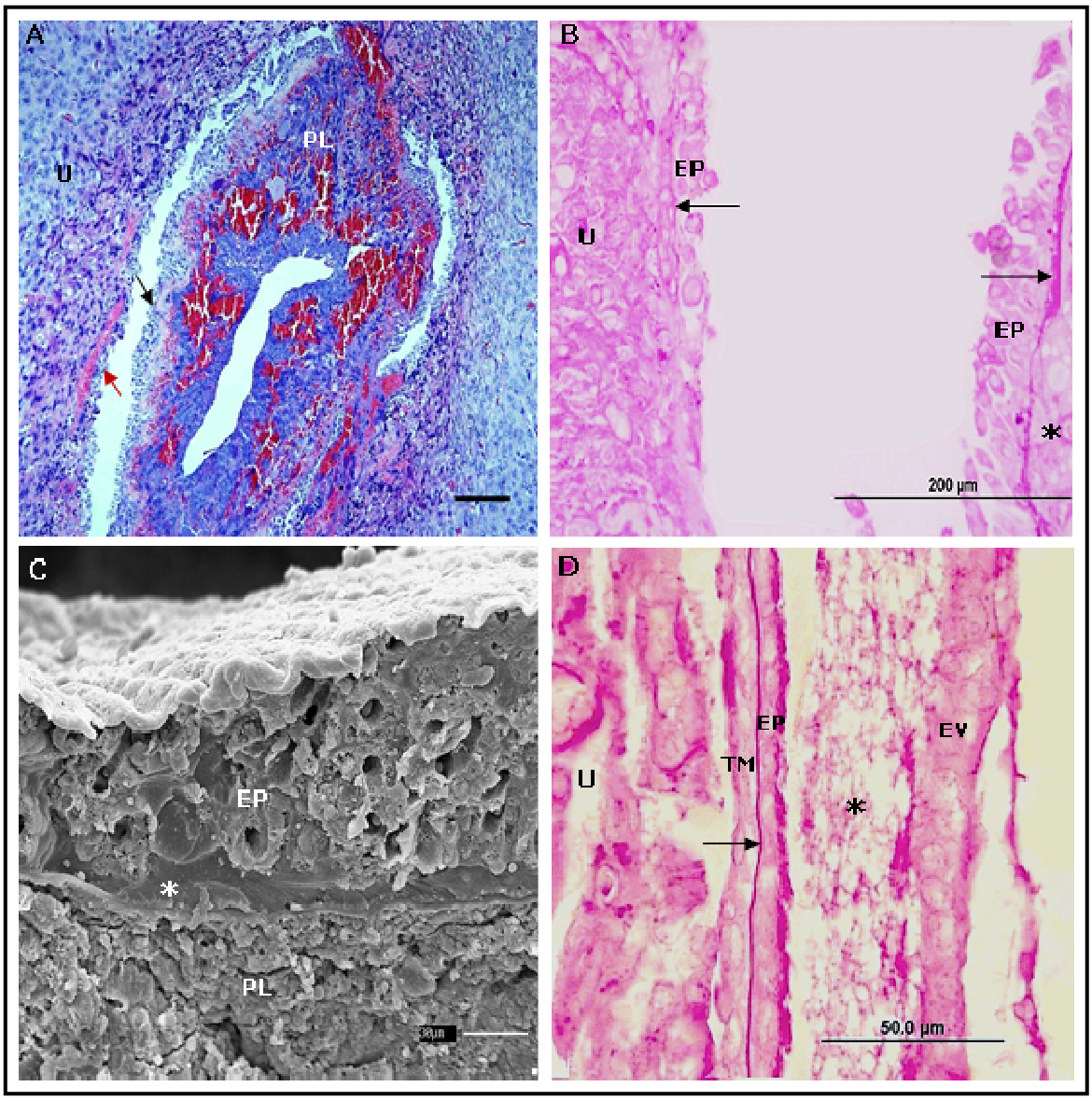
Desta forma, o desenvolvimento de uma placenta principal foi acompanhado pela formação dos endodermas visceral e parietal delimitando a cavidade do saco vitelino e constituindo a placenta vitelínica.

O endoderma parietal que revestia a superfície da placenta principal separou-se desta última por uma membrana basal de Reichert a qual se apresentou positiva para a reação do ácido periódico de Shiff (P.A.S) como observado na Figura 6B. Além disso, esta lâmina basal mostrou-se bem desenvolvida quando visualizada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 6C). Nestes locais, as células endodérmicas apresentaram formato colunar e numerosas vilosidades ao longo do disco placentário.

Já a porção de endoderma parietal que se encontrava associado ao trofoblasto mural, circunscrevendo toda a área da decídua capsular, apresentou grânulos glicoproteicos fortemente positivos para a reação do P.A.S nas superfícies apicais das células endodérmicas. Estas células possuíram morfologia prismática e apoiavam-se na membrana basal de Reichert.

Em disposição mais interna, acompanhando o endoderma parietal e envolvendo o embrião, evidenciou-se o endoderma visceral que por sua vez era vascularizado pelo mesoderma subjacente que continha vasos sanguíneos vitelínicos (Figura 6D).

Figura 6 – Disposição do endoderma parietal antes da inversão em preás aos 12 dias de gestação. Em A: Corte transversal do saco gestacional demonstrando o revestimento das células endodérmicas parietais na superfície da placenta corioalantoide (PL) (seta preta) e no útero (U) (seta vermelha). Barra = 90 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Corte transversal do saco gestacional evidenciando o revestimento endodérmico parietal no útero (U) e placenta principal (*). Observar a proeminente membrana de Reichert (setas) positiva para a reação do ácido periódico de Shiff. Barra = 200 µm. Ácido periódico de Shiff. Em C: Observar a membrana de Reichert (*) separando o endoderma parietal (EP) do sincício marginal da placenta corioalantoide (PL). Barra = 30 µm. Microscopia eletrônica de varredura. Em D: Região distante da placenta principal. Observar o útero (U), o trofoblasto mural (TM) e os endodermas parietal (EP) e visceral (EV) delimitando a cavidade do saco vitelino (*). Barra = 50 µm. Ácido periódico de Shiff.



Fonte: Acervo do pesquisador.

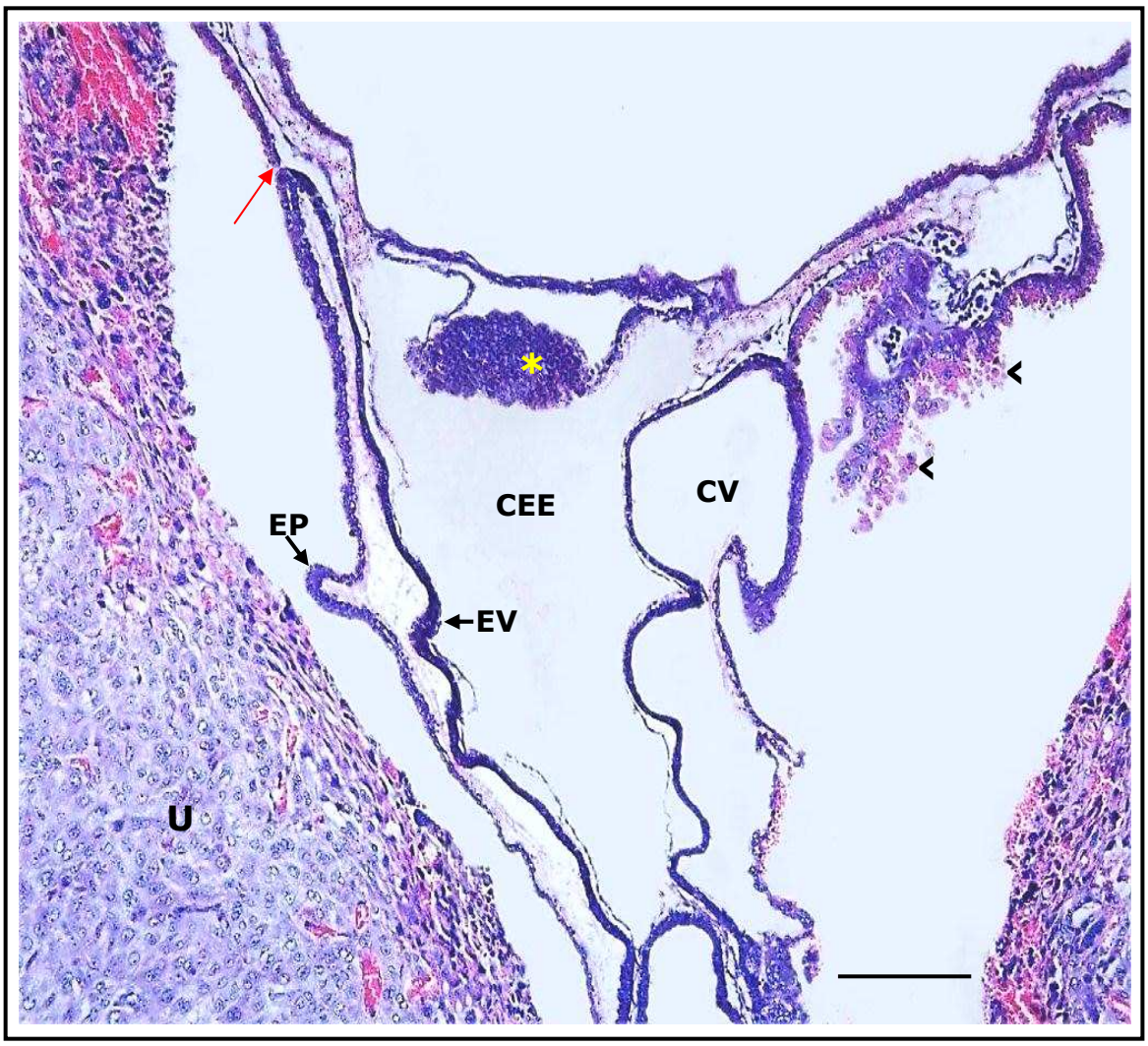
É interessante ressaltar que um saco gestacional aos 13 dias de gestação, após processamento histológico e análise em microscópio de luz, não apresentou o endoderma parietal em contato com a decídua capsular. Além disso, não foi possível a observação do trofoblasto mural e membrana de Reichert que juntamente com o endoderma parietal estariam relacionadas à estrutura da onfalopleura bilaminar. Talvez esta condição estivesse correlacionada ao processamento do material, levando-se em conta a fragilidade das membranas fetais e a dificuldade em se manter de forma inalterada todos os componentes do saco gestacional.

Outro raciocínio passível de ser aplicado a este paradigma foi à obtenção de uma amostra durante a inversão do saco vitelino. Esta possibilidade poderia suscitar interpretações de que as primeiras estruturas a degenerarem no processo de inversão, seriam o trofoblasto mural e membrana de Reichert subjacente.

Independentemente da explicação real para o arranjo anatômico observado foi à possibilidade de estabelecer como condição primordial para caracterizar uma situação anterior à inversão, a persistência de pelo menos um dentre o três componentes que compõem a onfalopleura bilaminar, neste caso o endoderma parietal (Figura 7).

Ainda com relação à figura sete, observou-se o aumento da cavidade celomática devido ao revestimento mesodérmico abaixo do endoderma visceral e em consequência, uma diminuição da cavidade do saco vitelino. O embrioblasto encontrou-se completamente envolvido pelo endoderma visceral, sendo neste último verificado o desenvolvimento de vilosidades concentradas em algumas regiões na extensa membrana visceral.

Figura 7 – Saco gestacional de preá aos 13 dias de gestação em situação anterior a inversão do saco vitelino. Observar o blastocisto (*) no interior da cavidade amniótica, o útero (U) e a cavidade do celoma extraembrionário (CEE). Notar que antes da inversão, o saco vitelino apresentou uma cavidade (CV) delimitada pelo endoderma parietal (EP) e visceral (EV). Evidencia-se o local onde os endodermas se encontram (seta vermelha). Verificar ainda que o endoderma visceral torna-se viloso em determinados locais (cabeças de seta). Barra = 108 µm. Coloração Hematoxilina e eosina.



Fonte: Acervo do pesquisador.

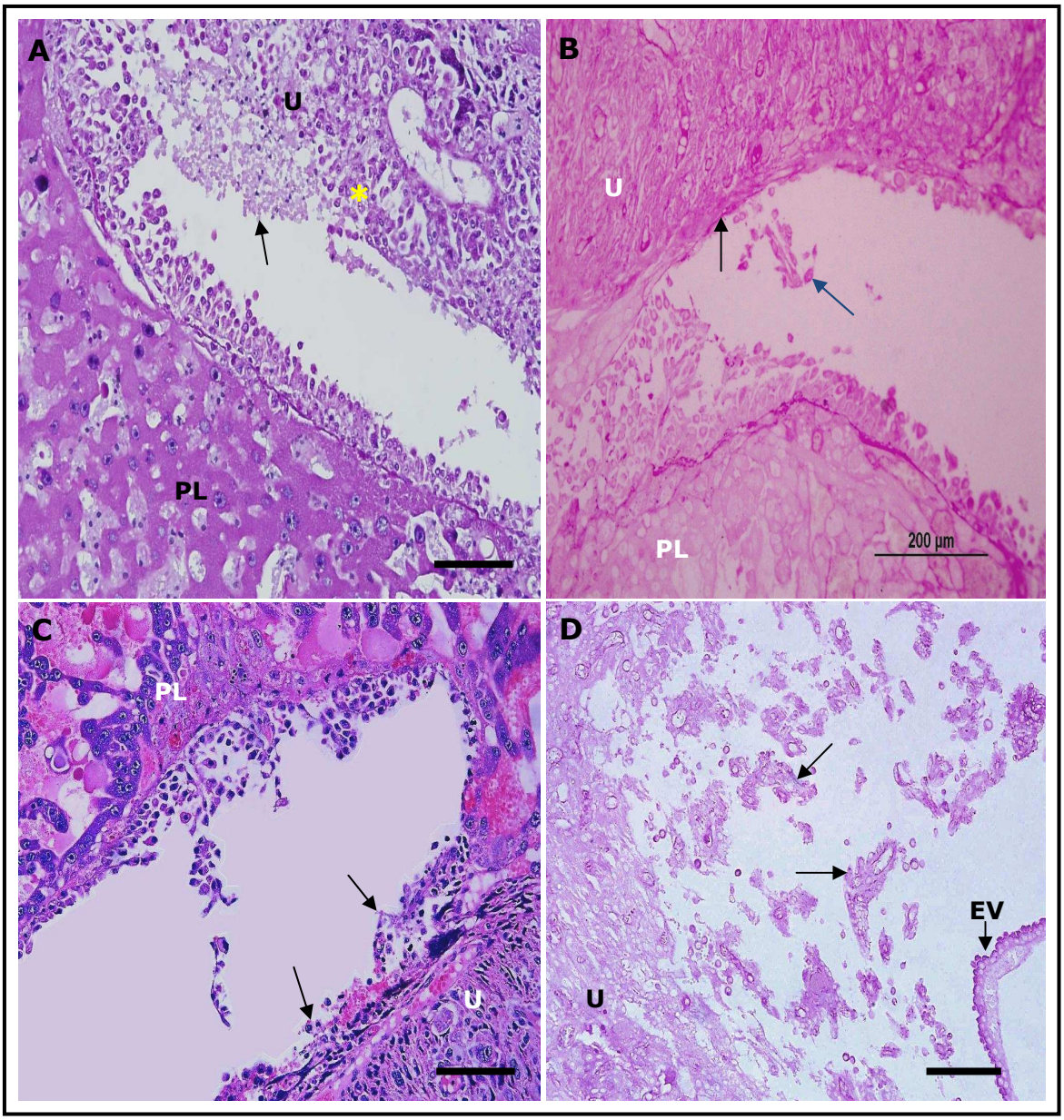
5.2.3 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL DURANTE A INVERSÃO DO SACO VITELINO

A inversão do saco vitelino ocorreu no décimo quarto dia de gestação em preás de acordo com as condições estabelecidas no presente estudo. Neste período gestacional, foram processados e analisados três sacos gestacionais obtidos de fêmeas diferentes de modo a ratificar o processo de inversão. Nos três botões embrionários verificados, observou-se elevada desorganização estrutural das células endodérmicas parietais que revestiam a decídua capsular (Figura 8).

Com relação à possibilidade da condição observada ser decorrente da produção de artefatos, esta foi descartada devido à integridade preservada dos outros elementos que compunham o saco gestacional.

Devido ao fato da presença de pequenas diferenças individuais terem sido observadas em cada saco gestacional analisado, procurou-se descrever as respectivas modificações observadas denominando cada amostra como saco gestacional um (SG1), dois (SG2) e três (SG3). No SG1 verificaram-se degeneração inicial da onfalopleura bilaminar localizada próxima à placenta principal e áreas de sangue materno extravasado (Figura 8A). Já no SG2 evidenciaram-se degenerações do endoderma parietal e a presença de resquícios da membrana de Reichert em aposição ao tecido uterino (Figura 8B). No SG3 o revestimento epitelial de endoderma parietal apresentou-se descontínuo próximo à placenta principal e completamente desestruturado em locais distantes da placenta corioalantoide como observado, respectivamente, nas figuras 8C e 8D.

Figura 8 – Inversão do saco vitelino no décimo quarto dia de gestação em três sacos gestacionais de preás. Em A: Saco gestacional um (SG1). Notar o início da degeneração da onfalopleura bilaminar (*) e extravasamento de sangue materno (seta) no interstício entre placenta principal (PL) e útero (U). Barra = 141 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Saco gestacional dois (SG2). Observar a degeneração de células endodérmicas parietais (seta azul) e escassez da membrana de Reichert (seta preta) distribuída apenas em alguns locais do útero (U). Barra = 200 µm. Ácido periódico de Shiff. As figuras C e D fazem referência ao saco gestacional três (SG3). Em C: Observar a desorganização epitelial do endoderma parietal (setas) revestindo a superfície do útero (U) em região próxima à placenta principal (PL). Barra = 144 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em D: Notar a extrema degeneração de células parietais (setas) em localização distal a placenta principal (PL) e a presença do endoderma visceral (EV). Barra = 140 µm. Ácido periódico de Shiff.



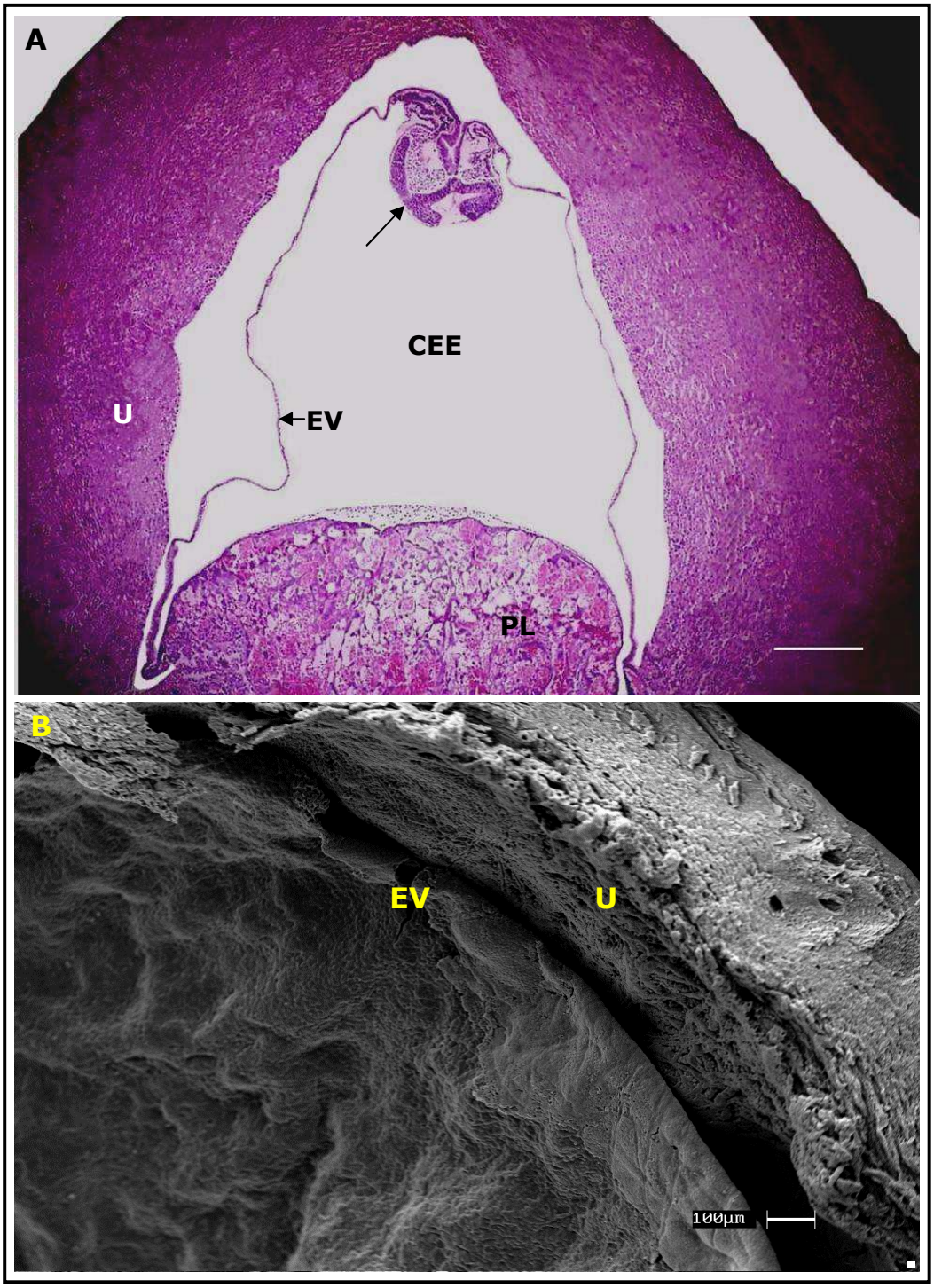
Fonte: Acervo do pesquisador.

5.2.4 DISPOSIÇÃO DOS ANEXOS FETAIS E PLACENTA PRINCIPAL APÓS A INVERSÃO DO SACO VITELINO

No décimo quinto dia de gestação destacaram-se as expansões do embrião e placenta corioalantoide, além do endoderma visceral que circunscrevia todo o contorno da decídua parietal.

Com o rompimento da onfalopleura bilaminar criou-se um mecanismo de aposição entre o endoderma visceral e útero de modo a garantir efetivas trocas de substâncias entre os tecidos maternos e fetais. Consequentemente, as células endodérmicas viscerais tornavam-se completamente expostas ao conteúdo secretado pelas glândulas uterinas (Figura 9).

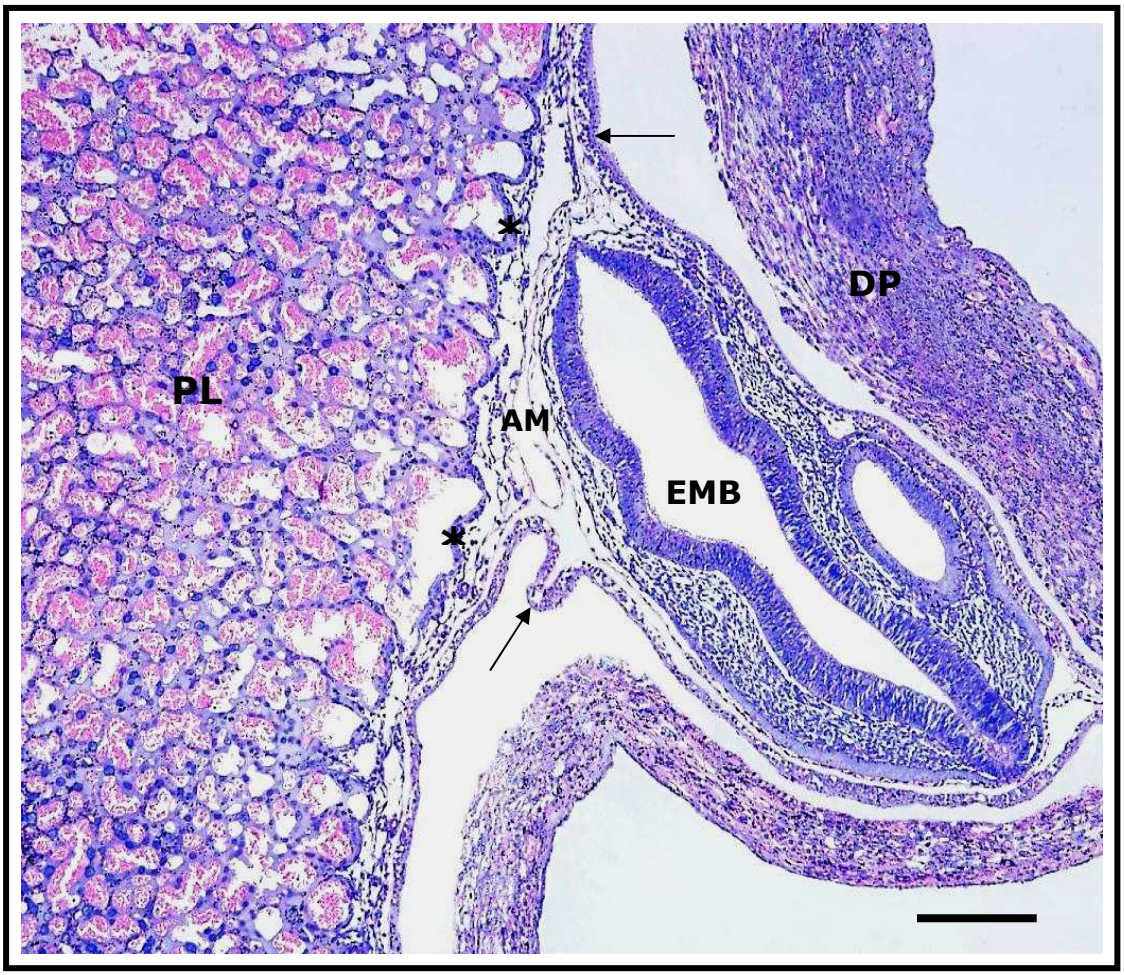
Figura 9 – Componentes do saco gestacional de preás aos 15 dias de gestação. Em A: Observar o embrião (seta), a cavidade do celoma extraembrionário (CEE) e a relação entre o endoderma visceral (EV) e o útero (U) após a inversão do saco vitelino. Barra = 91 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Notar a confluência entre o endoderma visceral (EV) e o útero (U). Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Acervo do pesquisador.

O vigésimo dia de gestação revelou contínua expansão do embrião e placenta corioalantoide, resultando nesta última, a formação de grande quantidade de lacunas maternas localizadas no labirinto placentário. Evidenciou-se ainda redução da cavidade celomática extraembrionária, promovendo aproximações entre os endodermas visceral e parietal situados na superfície fetal da placenta principal (Figura 10).

Figura 10 – Componentes do saco gestacional de preás aos 20 dias de gestação. Observar o desenvolvimento da placenta corioalantoide (PL), embrião (EMB) e âmnio (AM) resultando em aproximações dos endodermas visceral (setas) e parietal (*) na região da placenta principal. Notar ainda a decídua parietal (DP), estabelecida após a inversão do saco vitelino. Barra = 104 µm. Coloração Hematoxilina e eosina.



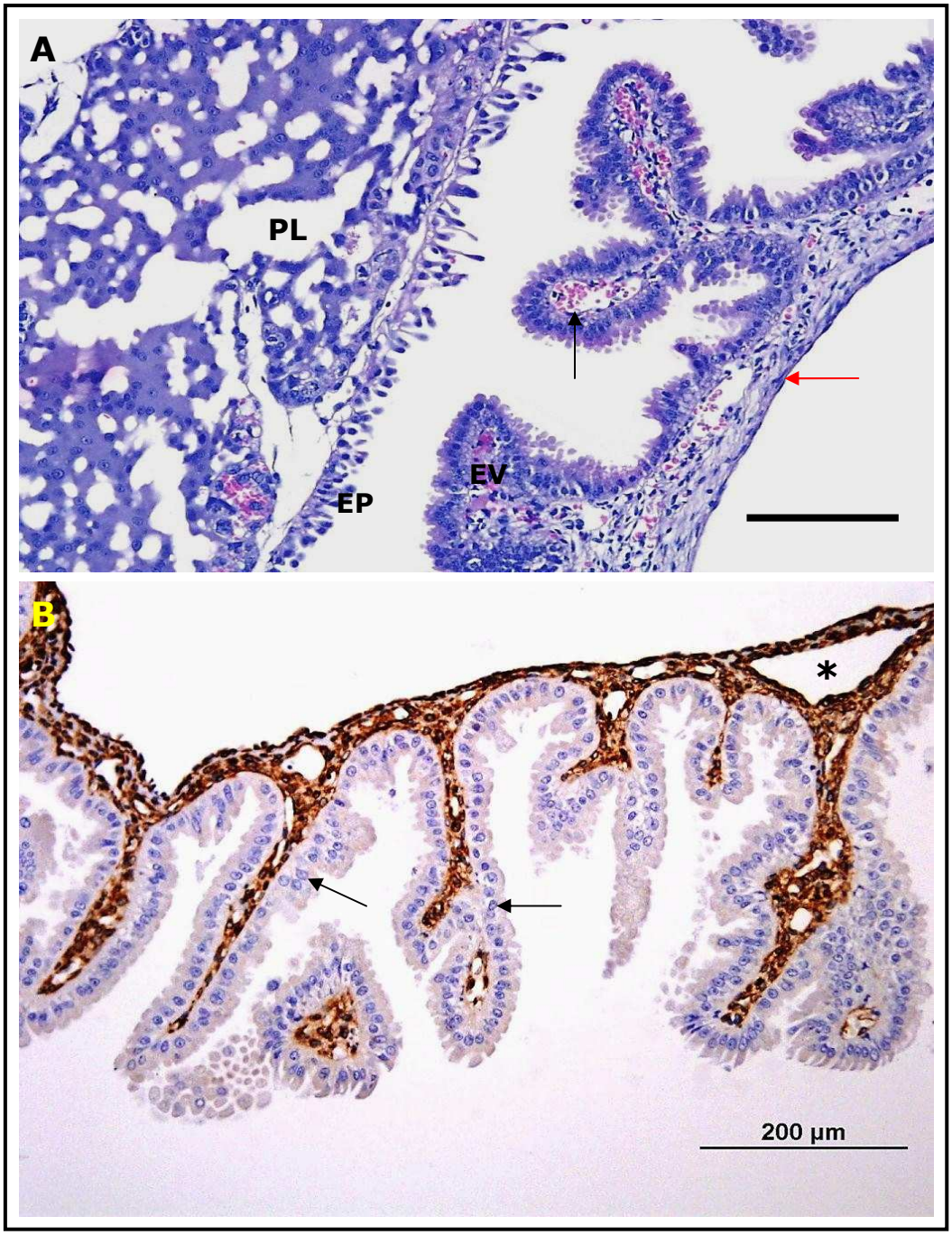
Fonte: Acervo do pesquisador.

As relações de aposição verificadas entre os endodermas localizados próximos à placenta principal favoreceram a interpretação de importantes locais para o intercâmbio de substâncias, constituindo vias bidirecionais entre placenta e embrião.

Nestes locais as células viscerais possuíram formato colunar, numerosas vilosidades e núcleos localizados na posição basal da célula. Além disso, tornou-se evidente aos 25 dias de gestação, a caracterização da esplancnopleura como sendo constituída por células endodérmicas viscerais que repousavam sobre uma lâmina basal visceral. Já na superfície externa do epitélio visceral, evidenciou-se uma segunda membrana basal revestindo as células mesoteliais que margeavam o celoma extraembrionário, sendo denominada membrana basal serosa (Figura 11A).

A reação imunohistoquímica para vimentina promoveu marcação específica para as células mesenquimais envolvidas na organização da vascularização vitelínica. A disposição destes vasos juntamente com a membrana basal visceral promovia a sustentação das formações vilosas direcionadas para o epitélio parietal da placenta principal (Figura 11B).

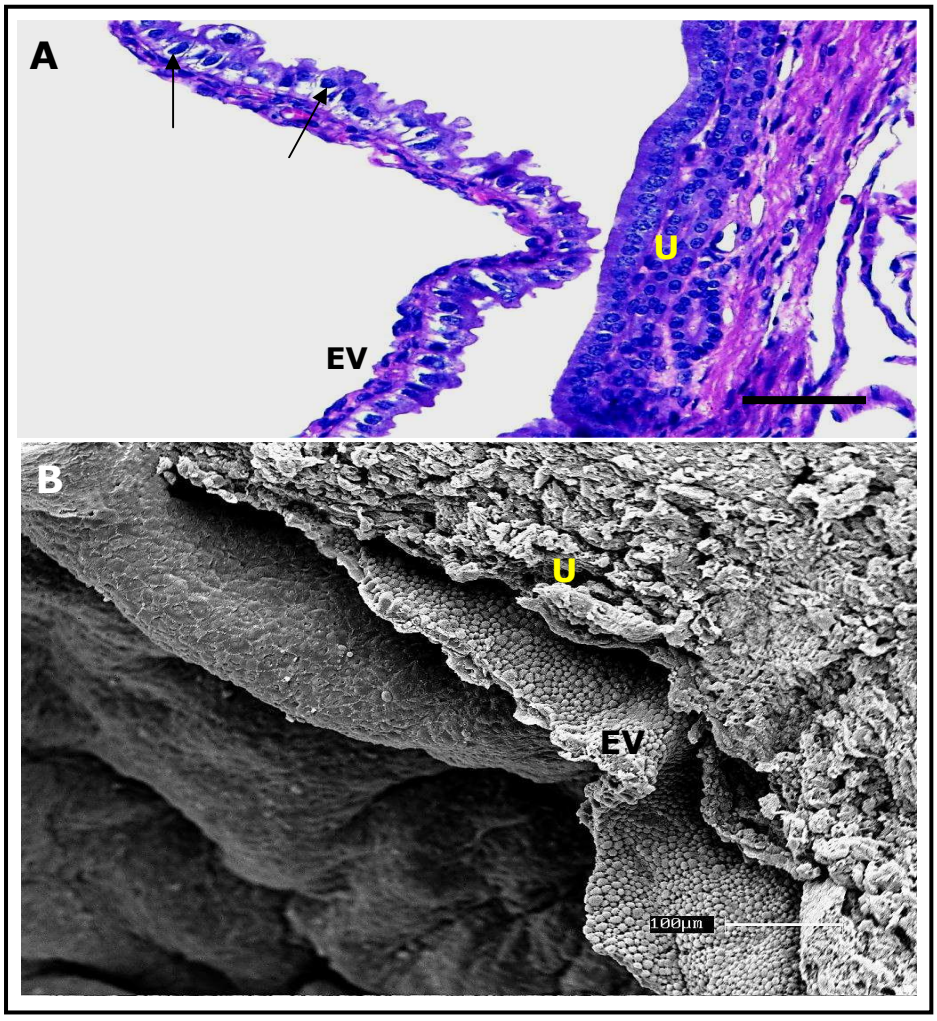
Figura 11 – Relações de aposição entre os endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantoide (PL) em preás aos 25 dias de gestação. Em A: Observar a formação de tufos ou vilos do endoderma visceral com respectivos núcleos na posição basal da célula. Notar a membrana basal visceral (seta preta) e membrana basal serosa (seta vermelha) formando o alicerce do epitélio visceral. Barra = 127 µm. Coloração azul de toluidina. Em B: Evidenciar a disposição dos núcleos na posição basal da célula (setas) e a intensa vascularização vitelínica (*) do endoderma visceral. Barra = 200 µm. Reação imunohistoquímica para vimentina.



Fonte: Acervo do pesquisador.

Nas regiões distais à placenta principal, o epitélio visceral apresentou poucas vilosidades e núcleos localizados predominantemente na posição apical da célula. Em determinados pontos da câmara de implantação, o endoderma visceral tornou-se extremamente próximo ao epitélio uterino representado pela decídua parietal. (Figuras 12A e 12B).

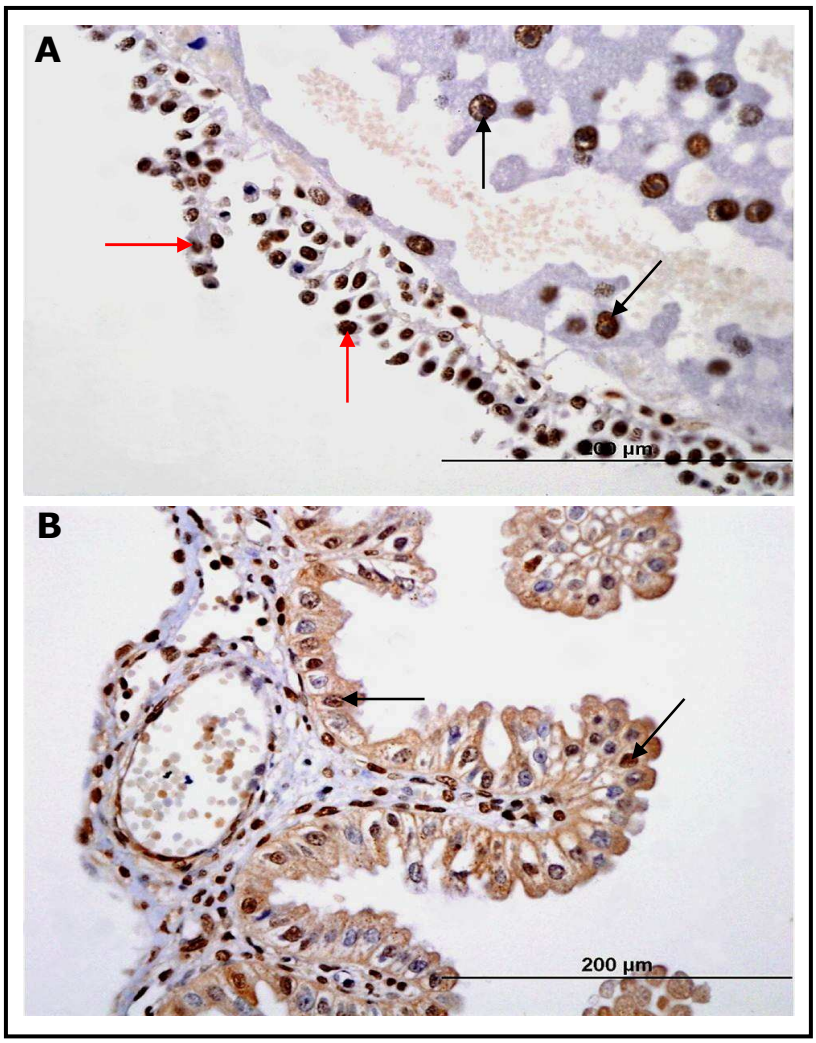
Figura 12 – Relações de aposição entre o endoderma visceral (EV) e útero (U) em região distal à placenta corioalantoide (PL) em preás aos 25 dias de gestação. Em A: Observar as células endodérmicas viscerais dotadas de poucas vilosidades e apresentando núcleos (setas) na posição apical da célula. Barra = 125 µm. Coloração Hematoxilina e eosina. Em B: Visualizar a estreita relação entre endoderma visceral (EV) e útero (U). Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Acervo do pesquisador.

É importante ressaltar que em todos os períodos gestacionais estudados as células do saco vitelino, placenta principal e embrião apresentaram intensa capacidade de proliferação celular. Esta característica foi confirmada pela reação positiva ao teste imunohistoquímico para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), sendo a resposta positiva caracterizada pela coloração marrom do núcleo (Figuras 13A e 13B).

Figura 13 – Capacidade proliferativa dos anexos fetais e placenta principal em preás aos 30 dias de gestação. Em A: Observar a reação positiva para o PCNA nos núcleos das células parietais (setas vesmelhas) e sincício marginal (setas pretas) da placenta corioalantoide. Barra = 200 µm. Em B: Notar o mesmo padrão de positividade (setas) nas células do endoderma visceral. Barra = 200 µm. Reação imunohistoquímica para o PCNA.



Fonte: Acervo do pesquisador.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

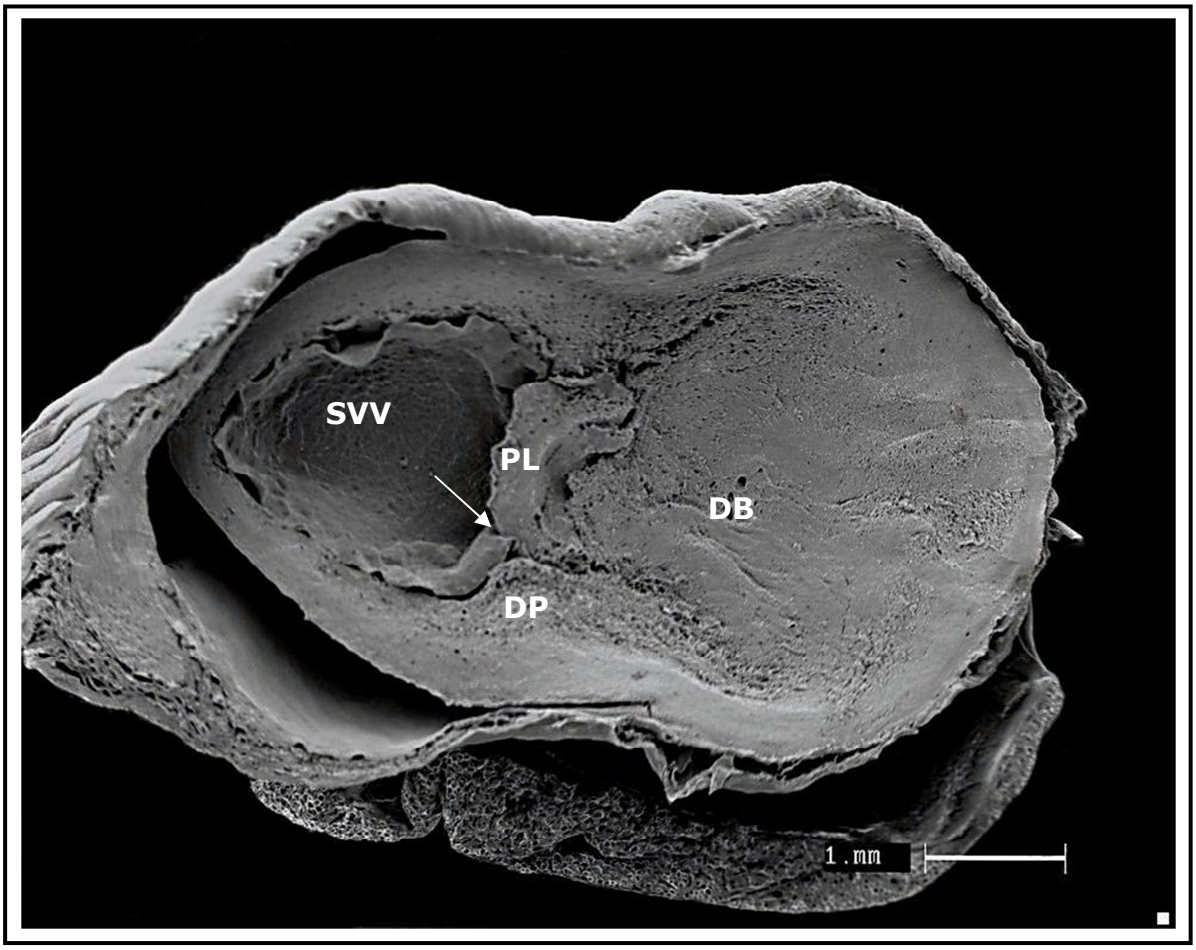
A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para demonstrar as disposições anatômicas do saco vitelínico visceral em relação ao tecido uterino e placenta principal, bem como os aspectos morfológicos das células endodérmicas em diferentes regiões anatômicas. Além disso, procurou-se evidenciar a forma como se dispunham os vasos vitelínicos e vilosidades ao longo da placenta vitelínica visceral, considerando a região do entorno da placenta corioalantoide e a região mais distal da mesma.

Após a inversão do saco vitelino, são favorecidas estreitas relações de aposição entre o endoderma visceral e epitélio uterino de modo a elevar o potencial absortivo de células endodérmicas, aptas à captação de substâncias secretadas pelas glândulas uterinas.

Estas características foram observadas a partir de íntimas relações anatômicas entre o saco vitelino visceral e o útero, além da inserção do endoderma visceral na extremidade da placenta principal. Como observado também nas análises macroscópicas, o saco vitelino visceral mostrou-se com aspecto viloso cujas vilosidades foram mais desenvolvidas nas regiões próximas da placenta principal.

O saco vitelino nesta fase apresentou-se completamente invertido, permanecendo com esta disposição durante todo o período gestacional, sendo esta característica confirmada nas análises macroscópicas de gestação a termo. O referido endoderma visceral apresentou forma esférica ou elipsoide, acompanhando todo o contorno da decídua parietal, proporcionando desta forma, estreita relação com o epitélio uterino. Diante disto, o endoderma visceral possuiu característica de órgão placentário na medida em que confere possível rota de transferência de substâncias oriundas tanto das glândulas uterinas quanto da placenta corioalantoide para o embrião com base nas relações anatômicas evidenciadas (Figura 14).

Figura 14 – Saco gestacional aos 30 dias onde pode ser observada a disposição espacial do saco vitelino visceral (SVV) e sua inserção (seta) na placenta corioalantoide (PL). Notar ainda a localização da decídua basal (DB) e parietal (DP). O SVV mantém estreita relação com a PL e o útero caracterizando uma estrutura anatômica favorável aos processos absortivos. Barra = 1000 µm. Microscopia eletrônica de varredura.



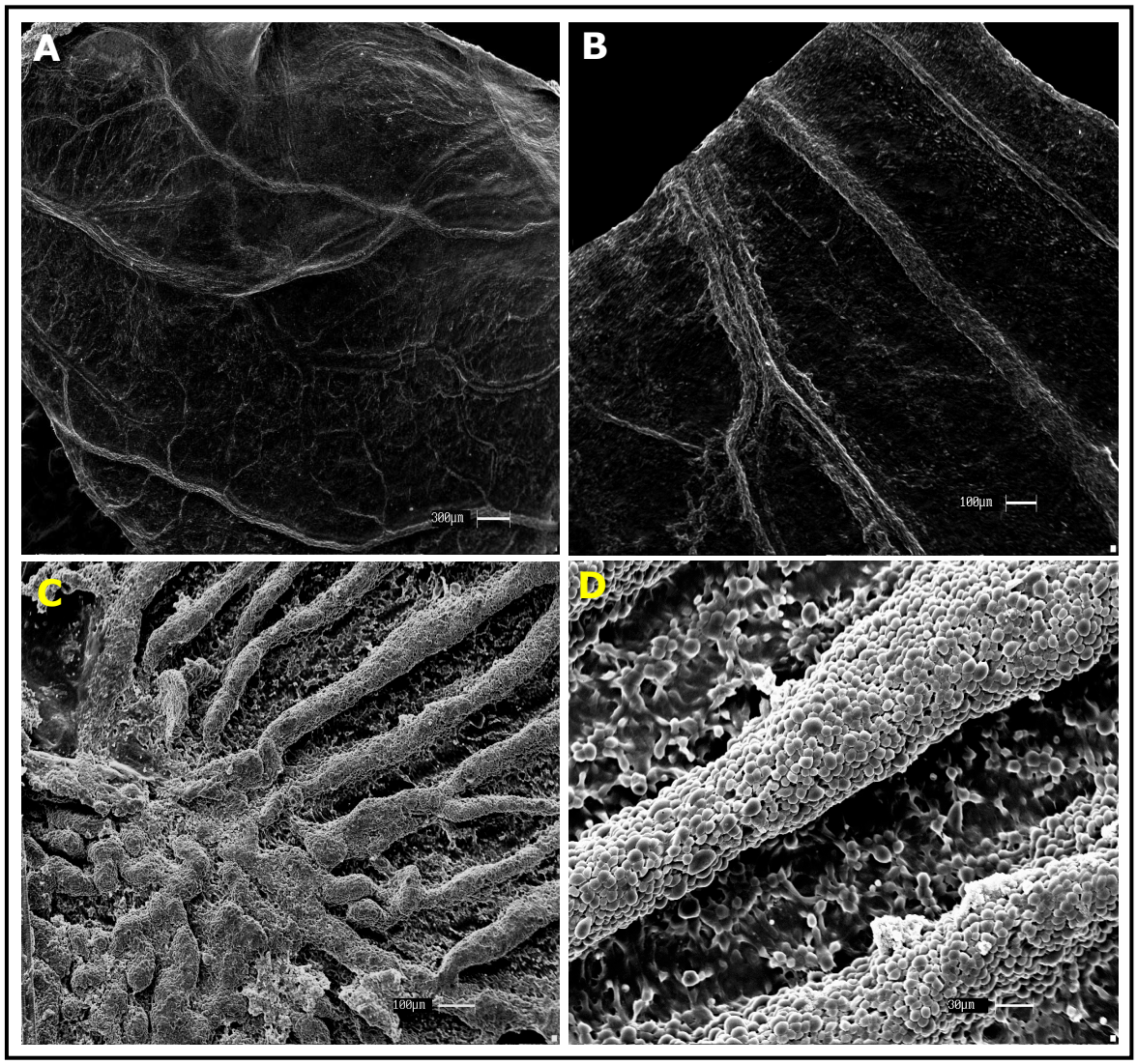
Fonte: Acervo do pesquisador.

Quanto à disposição dos vasos vitelínicos verificou-se que estes eram mais proeminentes e com numerosas ramificações nos locais mais distantes da placenta principal, ou seja, convergindo para o embrião. Próximas à placenta principal, artérias e veias vitelinas apresentaram-se retilíneas e paralelas, dotadas de maior calibre e em menor número quando comparadas aos vasos da região proximal.

É importante observar que as vilosidades vitelínicas se dispuseram ao longo da superfície da parede externa dos vasos. Como observado na macroscopia estes vasos partiam

de um ponto central e se distribuíam por toda membrana endodérmica deixando-a intensamente vascularizada (Figura 15).

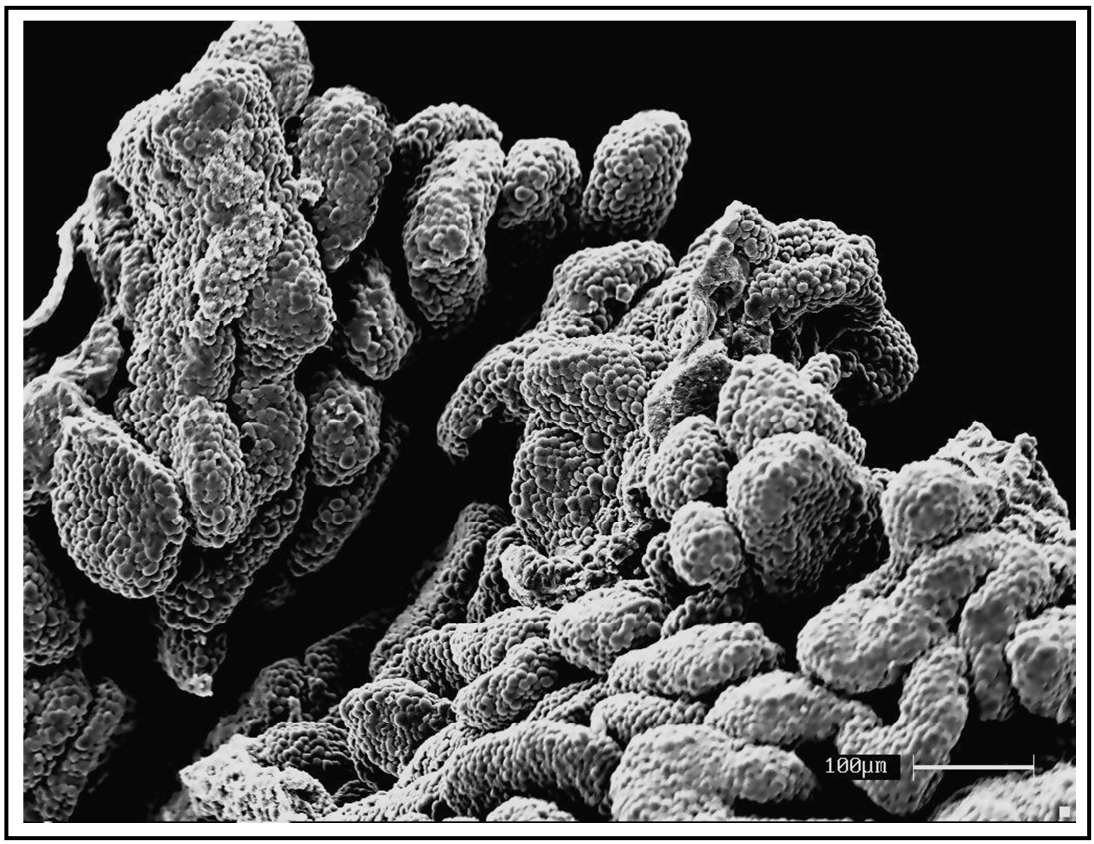
Figura 15 – Vascularização vitelínica de preás aos 30 dias de gestação em diferentes regiões anatômicas. A e C representam vasos vitelínicos situados na porção distal da placenta corioalantoide. B e D retratam vasos vitelínicos na região proximal desta placenta. Em A: Notar as numerosas ramificações e aspecto tortuoso dos vasos. Barra = 300 µm. Em B: Os vasos desta região apresentaram-se retilíneos e dispostos de forma paralela. Barra = 100 µm. Em C: Observam-se pontos de convergência vasculares, permitindo intensa distribuição capilar no endoderma visceral. Barra = 100 µm. D: Detalhe de dois vasos vitelínicos dispostos de forma paralela e as vilosidades do endoderma distribuídas entre estes vasos. Barra = 30 µm. Figuras de A até D: Microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Acervo do pesquisador.

As imagens tridimensionais obtidas por esse tipo de microscopia eletrônica possibilitaram a identificação de complexas projeções vilosas distribuídas ao longo de todo o endoderma visceral, embora tenham sido mais evidentes em regiões próximas ao disco placentário. Desta forma, muitas ramificações digitiformes mostraram-se facilmente discerníveis, sugerindo se tratarem de importantes locais para o intercâmbio nutricional (figura 16).

Figura 16 – Projeções vilosas do endoderma visceral próximas à placenta corioalantoide de preás aos 30 dias de gestação. Observar as dobras dos vilos bem definidas caracterizando um epitélio especializado. Barra = 100 µm. Microscopia eletrônica de varredura.

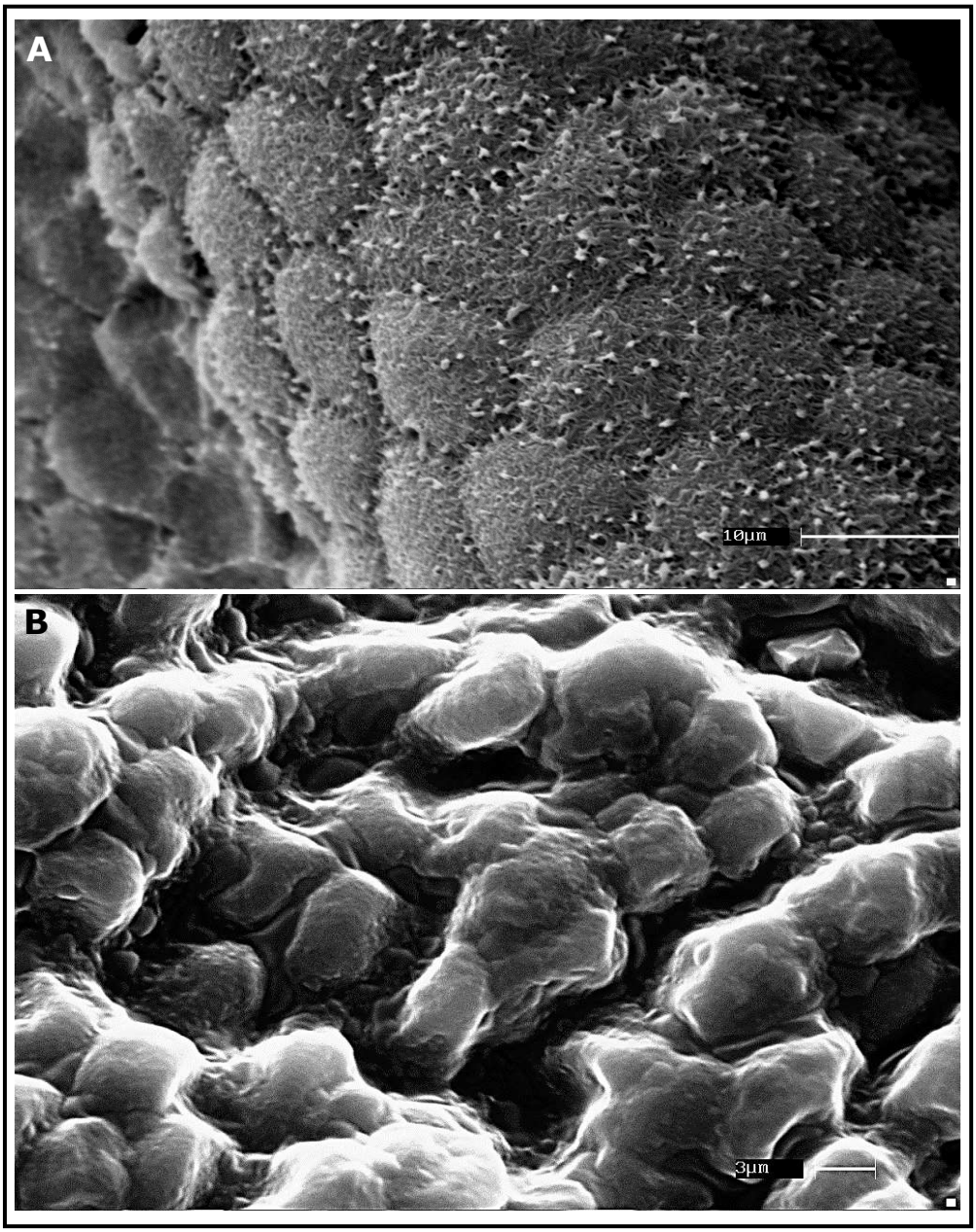


Fonte: Acervo do pesquisador.

As células endodérmicas viscerais mostraram-se heterogêneas com relação à superfície externa das membranas citoplasmáticas, quando analisadas em locais próximos e

distantes do disco placentário. Na região peri-placentária, observaram-se muitos prolongamentos citoplasmáticos nas células endodérmicas, variando de formas curtas a grandes. Tais estruturas foram caracterizadas como formações similares a pseudópodes, podendo-se inferir aspectos de dinâmica motora as células endodérmicas. Já nos locais distantes da placenta principal, evidenciou-se o epitélio visceral apresentando superfície celular bastante lisa (Figura 17).

Figura 17 – Células endodérmicas viscerais do saco vitelino invertido de preás aos 30 dias de gestação em diferentes regiões anatômicas. Em A: Evidenciaram-se numerosas projeções citoplasmáticas similares a pseudópodes em epitélio adjacente a placenta corioalantoide. Notar a variação de tamanho destas projeções. Barra = 10 µm. B: Em locais distantes da placenta, observaram-se células endodérmicas apresentando superfície externa lisa. Barra = 3 µm. Figuras A e B: Microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Acervo do pesquisador.

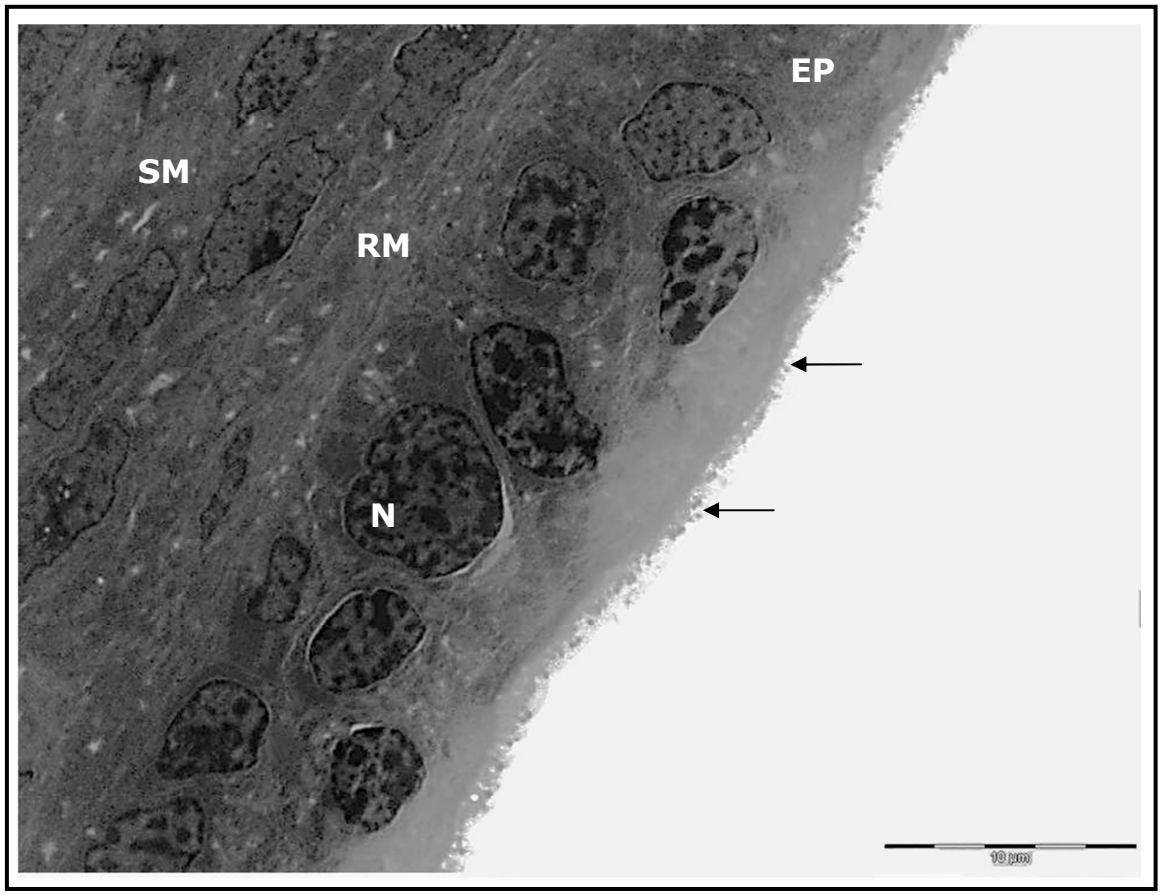
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os principais resultados alcançados por esta técnica possibilitaram a caracterização da placenta vitelínica parietal (revestindo a placenta principal) e visceral em situação posterior a inversão. Não foi possível evidenciar o processo de degeneração do endoderma parietal capsular durante a inversão do saco vitelino, pelo fato deste mecanismo ocorrer num período de 24 horas entre os dias 13 e 14 de gestação em preás.

Como o fenômeno da inversão poderia acontecer em qualquer período nessas 24 horas, tornou-se muito difícil eletromicrografar o momento exato em que ocorreria. No entanto, nossos resultados atenderam aos principais objetivos propostos, pelo fato de se poderem inferir aspectos funcionais do saco vitelino a partir dos achados ultraestruturais de modo a caracterizar possíveis consequências de um epitélio visceral em aposição aos tecidos maternos.

A placenta vitelina parietal apresentou as células endodérmicas com citoplasma abundante e a maioria dos núcleos dispostos na porção basal da célula. A cromatina nuclear possuiu aspecto finamente granular, com regiões de heterocromatina e eucromatina. Na porção apical das células, verificaram-se muitas microvilosidades direcionadas para o celoma extraembrionário. Separando o epitélio parietal do sincício marginal da placenta principal subjacente, evidenciou-se uma espessa membrana basal de Reichert (Figura 18).

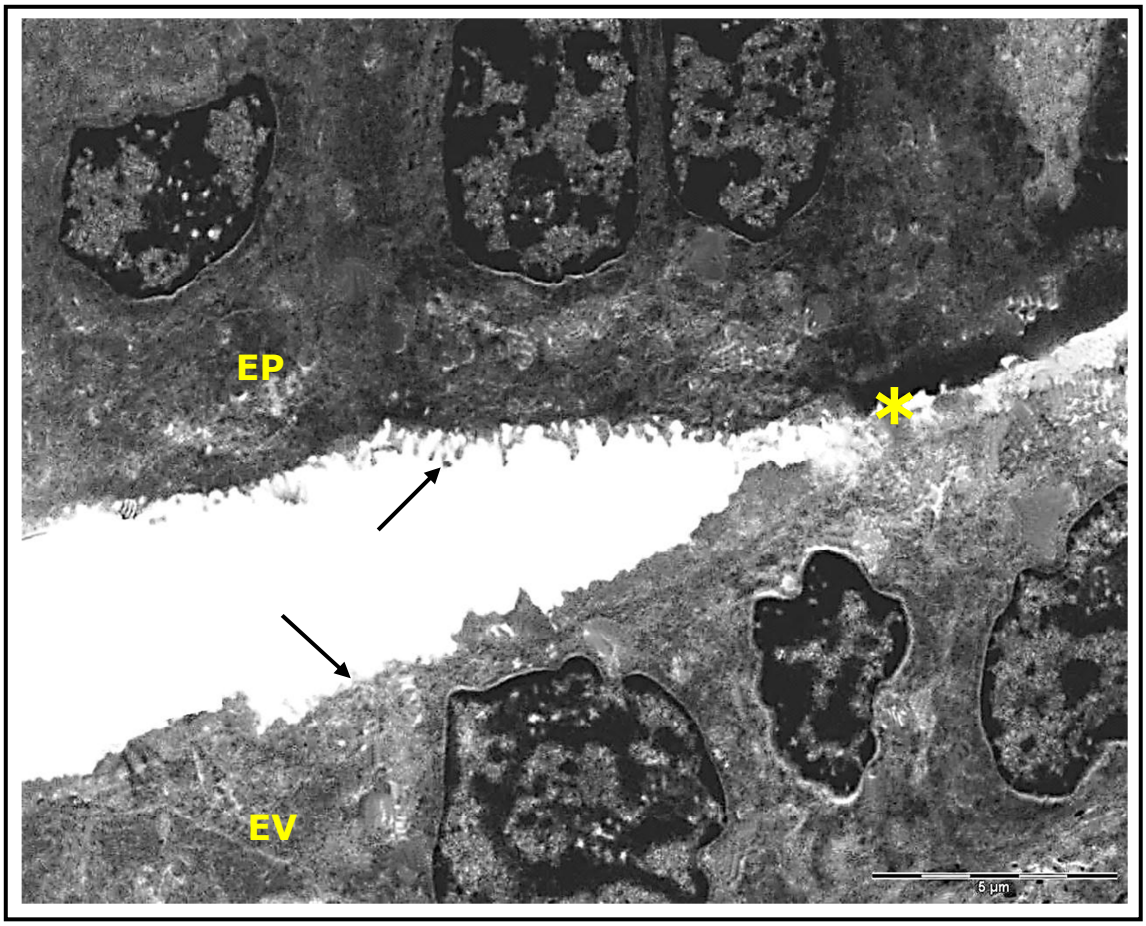
Figura 18 – Eletromicrografia da placenta vitelina parietal (EP) de preás aos 14 dias de gestação. Observar a predominância dos núcleos (N) na região basal da célula e numerosas microvilosidades apicais (setas). Notar ainda a membrana de Reichert (RM) apoiando o endoderma parietal e separando-o da placenta corioalantoide na região do sincício marginal (SM). Barra = 10 µm. Microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Acervo do pesquisador.

Nas margens da placenta corioalantoide, verificaram-se processos de aposição entre os endodermas visceral e parietal, sendo suas vilosidades confluentes. De fato, esta relação estrutural pode vir a conferir possíveis rotas de transferências de substâncias, tanto por esta relação anatômica (Figura 19) quanto pelas vesículas eletrodensas, distribuídas ao longo da superfície citoplasmática dessas células (Figura 20).

Figura 19 – Eletromicrografia dos endodermas visceral (EV) e parietal (EP) as margens da placenta corioalantoide em preás aos 14 dias de gestação. Observar as relações de aposição entre as células e as numerosas microvilosidades apicais (setas) proporcionando possíveis áreas de trocas entre os endodermas. Notar as áreas em que os dois epitélios mantém íntimo contato (*). Barra = 5 µm. Microscopia eletrônica de transmissão.

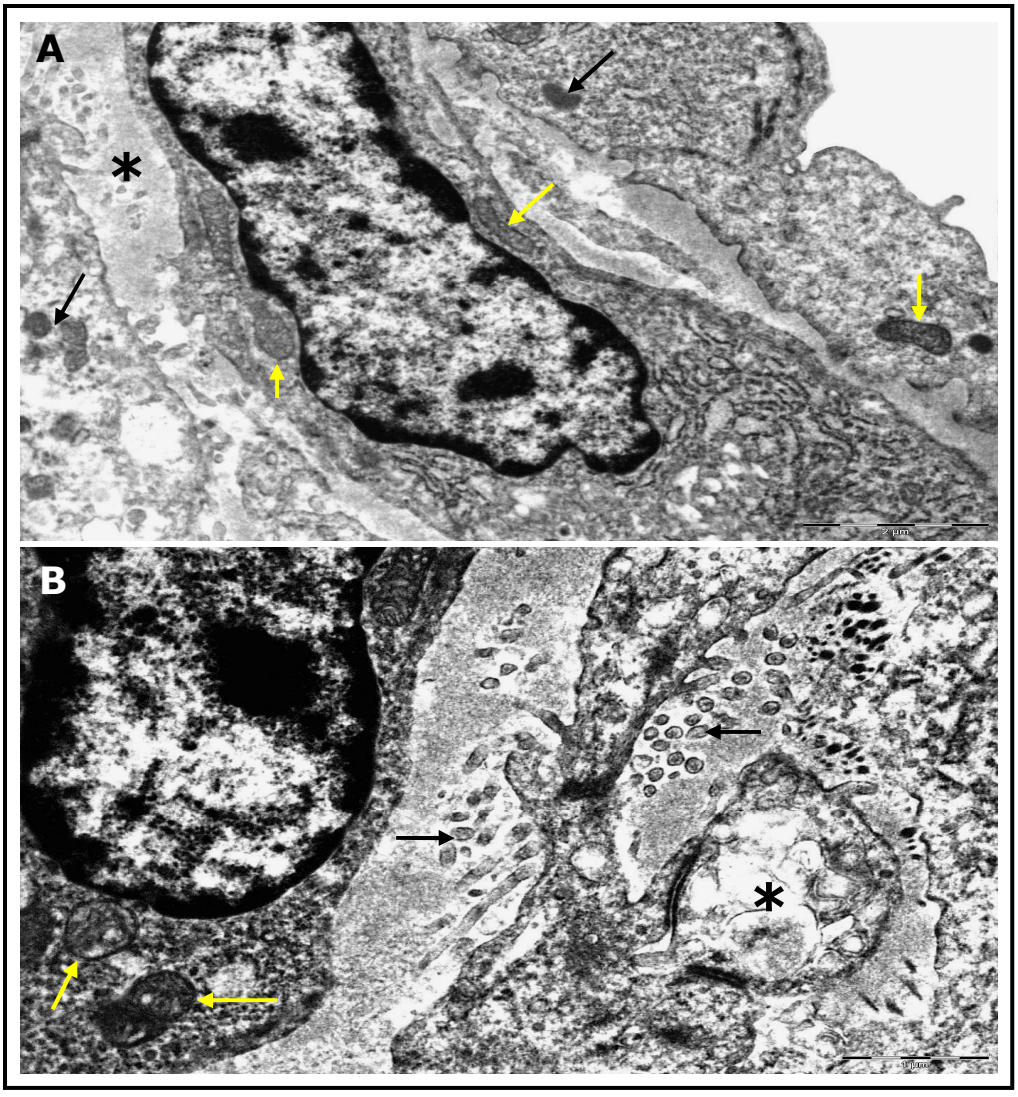


Fonte: Acervo do pesquisador.

A figura 20 evidenciou a estrutura fina de células endodérmicas viscerais, situadas as margens da placenta principal. Verificaram-se cisternas do retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidas, localizadas predominantemente na região infranuclear. Vesículas com eletrodensidade variável foram encontradas, distribuindo-se ao longo da superfície do retículo. Em algumas células, foi possível observar grandes vesículas, provavelmente resultantes do processo de endocitose. Além disso, verificou-se a distribuição das mitocôndrias principalmente na região perinuclear da célula. Outra característica que chamou

atenção foram os espaços intercelulares proeminentes, apresentando numerosas microvilosidades cujo aspecto é bastante similar às encontradas na região apical da célula.

Figura 20 – Eletromicrografia de células endodérmicas viscerais situadas próximas à placenta principal de preás aos 14 dias de gestação. Em A: Observar as numerosas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, localizadas principalmente na região infranuclear da célula. Notar a presença de mitocôndrias (setas amarelas) em áreas perinucleares, vesículas eletrodensas (setas pretas) e espaço intercelular (*). Barra = 2 µm. Em B: Detalhe de dois espaços intercelulares proeminentes, repletos de microvilosidades (setas pretas) direcionadas para a luz deste espaço. Notar ainda vesículas eletrodensas (setas amarelas) e uma grande vesícula (*), provavelmente de endocitose. Barra = 1 µm. Microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Acervo do pesquisador.

O epitélio visceral, distante da placenta principal, apresentou formas arredondadas e/ou ovais, várias vesículas com eletrodensidade variável e escassas vilosidades. Logo abaixo

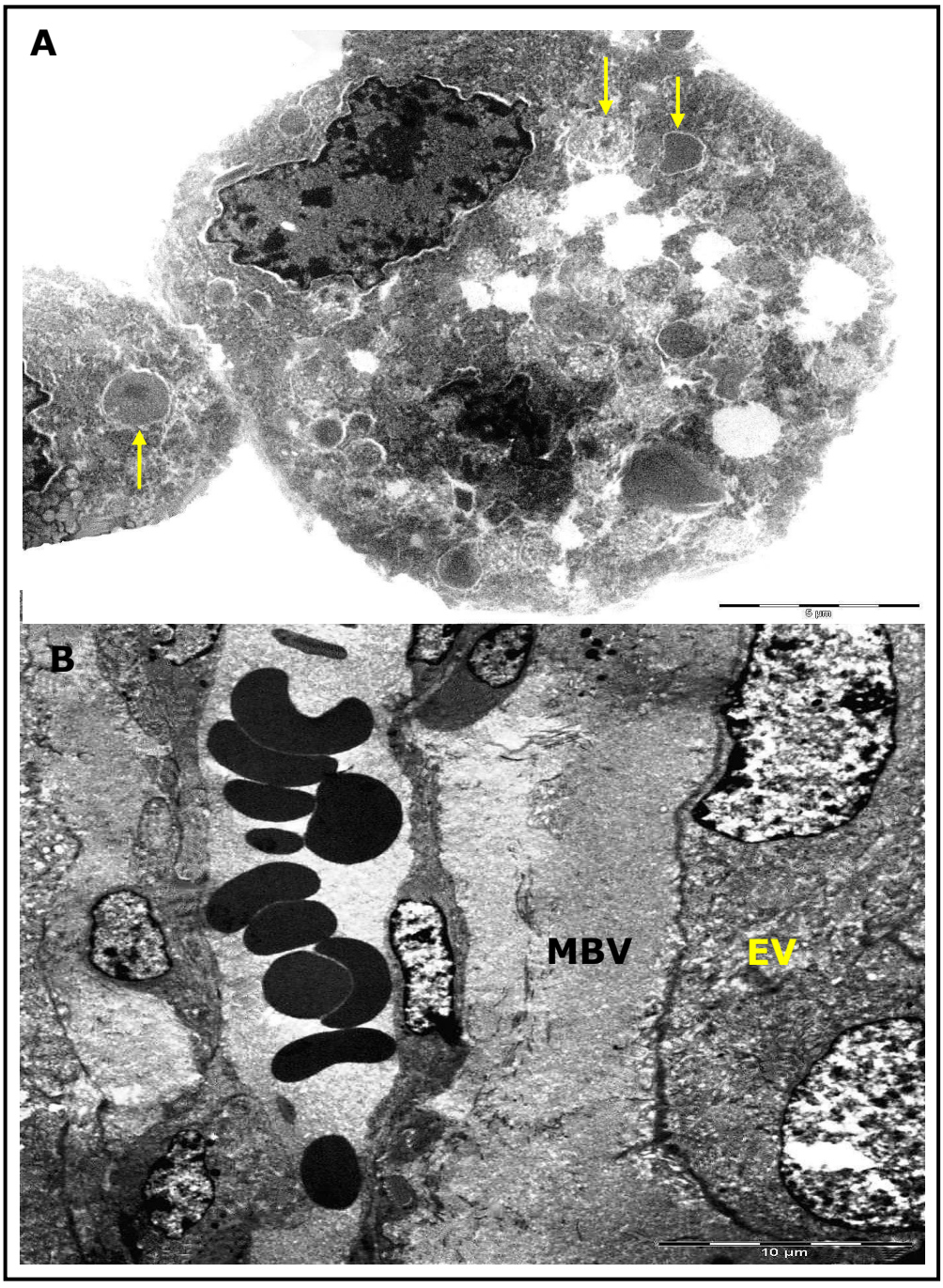
deste endoderma, foi observada uma espessa membrana basal visceral que separava o endoderma visceral dos vasos vitelínicos subjacentes (Figura 21A).

Quanto à distribuição da vascularização vitelina, estes se encontraram presentes ao longo de todo o saco vitelino visceral, não sendo visualizadas fenestrações entre as células endoteliais destes vasos (Figura 21B).

Todas as características celulares observadas por este método e as diferenças verificadas quanto à distribuição das vilosidades vitelínicas, morfologia da superfície celular, estreitas relações de aposição entre os endodermas forneceram subsídios para um melhor entendimento das relações anatômicas resultantes de uma posterior situação de inversão do saco vitelino. Tais achados, quando correlacionados a outras metodologias utilizadas neste trabalho sugerem ser bastante vantajosa para o desenvolvimento fetal, a dinâmica da inversão do saco vitelino.

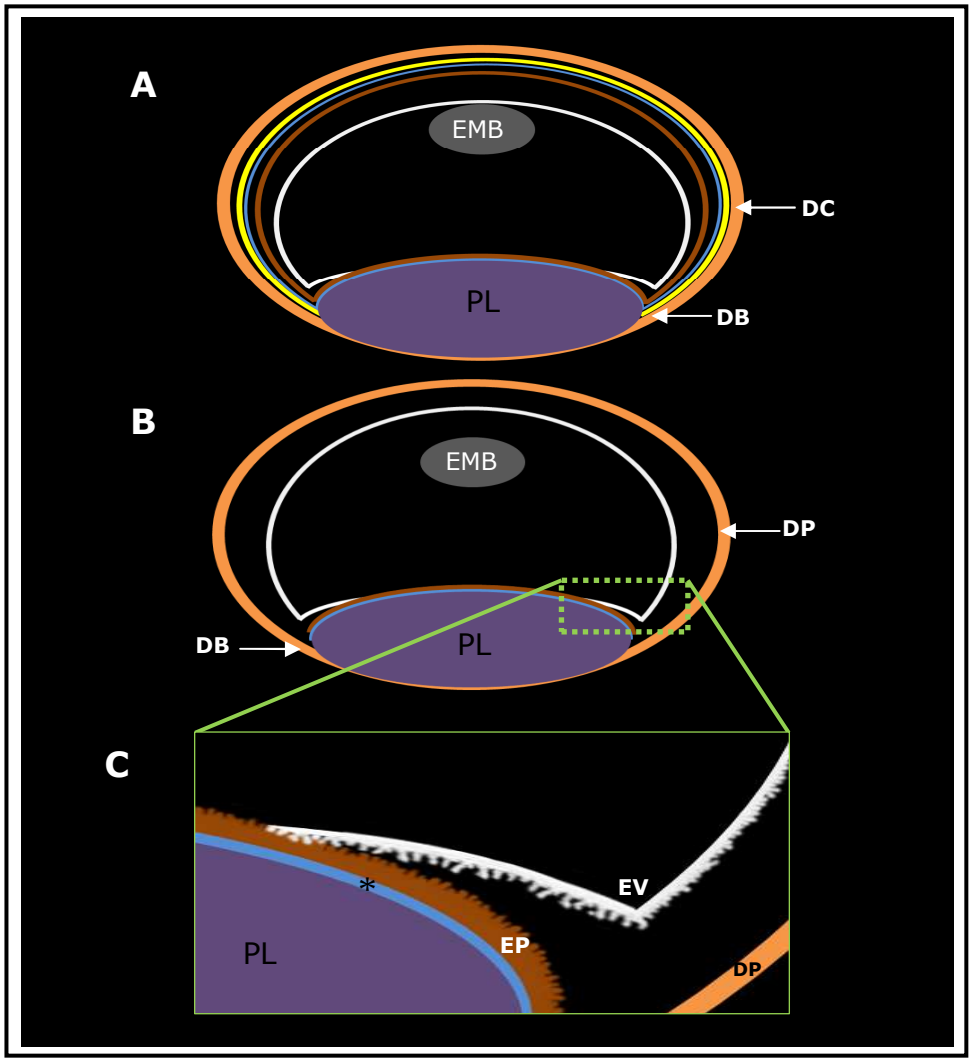
Conforme descrito, as modificações verificadas no tocante à disposição espacial das membranas fetais do saco gestacional conferem certo dinamismo ao processo de inversão, fato este demonstrado também de forma esquemática (figura 22) para facilitar o entendimento relativo a este processo.

Figura 21 – Eletromicrografia do endoderma visceral (EV) distante da placenta corioalantoide em preás aos 14 dias de gestação. Em A: Observar uma célula endodérmica visceral arredondada contendo grande quantidade de vesículas com eletrodensidades diferentes na superfície citoplasmática (setas). Barra = 5 µm. Em B: um vaso vitelínico separado do endoderma por uma espessa membrana basal visceral (MBV). Barra = 10 µm. Microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Acervo do pesquisador.

Figura 22 – Representação esquemática dos elementos que compõe o saco gestacional em situação anterior e após a inversão do saco vitelino. Em A: Disposição das membranas antes da inversão. Observar o útero, constituído pelas decíduas capsular (DC) e basal (DB). Evidenciar o trofoblasto mural (em amarelo), a membrana de Reichert (*) (em azul) acompanhando todo o contorno do trofoblasto mural e ainda, localizando-se na superfície fetal da placenta corioalantoide (PL). Em marrom, evidencia-se o endoderma parietal, contornando a membrana de Reichert e revestindo a superfície fetal da placenta principal. Em conjunto, trofoblasto mural, membrana de Reichert e endoderma parietal são denominados onfalopleura bilaminar. Observar o endoderma visceral (em branco) e as localizações da placenta corioalantoide e do embrião (EMB). Em B: Evidencia-se uma situação posterior à inversão, ocasionada pela degeneração da onfalopleura bilaminar, resultando em íntima relação entre o endoderma visceral e útero. Este último passa a ser constituído pelas decíduas parietal (DP) e basal. Em C: Detalhe das vilosidades dos endodermas parietal (EP) e visceral (EV) em região proximal a placenta corioalantoide, representando importantes locais para o intercâmbio de substâncias.



Fonte: Acervo do pesquisador

6 DISCUSSÃO

Tomando como base os resultados mais relevantes para o presente trabalho, realizaram-se comparações com aqueles já descritos por outros autores de modo a integrar as principais informações obtidas e fornecer elementos para a conclusão.

Os conhecimentos da série de eventos envolvidos desde a concepção, englobando os processos de implantação, formação dos anexos fetais, desenvolvimento placentário, até a formação de um novo individuo, são fundamentais para caracterizar o padrão reprodutivo de uma espécie ao mesmo tempo em que fornece subsídios para manutenção da mesma.

A placentação compreende todos os mecanismos de interação entre os tecidos maternos e membranas fetais envolvidos na formação de um órgão placentário temporário, capaz de produzir o sucesso reprodutivo de uma espécie.

Dentro deste contexto, verifica-se atualmente, estudos de placentação que correlacionam os aspectos morfológicos com informações resultantes de pesquisas utilizando biologia molecular no estabelecimento de correlações filogenéticas entre as diversas ordens dos mamíferos (CARTER, 2001; MESS; CARTER, 2006; MESS; CARTER, 2007). Tais investigações promovem valiosas informações sobre genes relacionados ao desenvolvimento placentário (CROSS et al., 2003) e até mesmo a possibilidade de reconstrução filogenética de uma condição ancestral de modo que se torne possível o entendimento da evolução da placenta nos mamíferos (MESS; CARTER, 2007).

Wislocki et al. (1946) já admitiam que a placenta de roedores constituía uma estrutura de maior complexidade quando comparada a placenta de gatos, porcos e até mesmo no homem. Tal complexidade se relacionava as modificações ocorridas nos tecidos maternos, trofoblasto e saco vitelino, principalmente no início do desenvolvimento embrionário.

No entanto, a busca por modelos experimentais que possibilitem uma melhor compreensão da placentação humana favorecem a utilização de roedores devido a estreitas similaridades que ambos apresentam (CARTER et al., 2006; CARTER, 2007).

Além disso, a ordem dos roedores oferece extraordinária capacidade de adaptação ecológica aos diversos tipos de ambientes e climas (BRASIL, 2002), associado a características reprodutivas que facilitam as pesquisas científicas no tocante a placentação.

Estas características determinaram a escolha do preá como unidade experimental para o presente trabalho bem como pela escassa literatura científica acerca da utilização deste animal em pesquisas de placentação.

A placenta é formada pela íntima associação entre membranas fetais e epitélio uterino de forma a facilitar as trocas fisiológicas (SANSOM, 1922; MOSSMAN, 1987; JOLLIE, 1990; SCHRÖDER, 1995; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999; CARTER et al., 2004). A estrutura anatômica varia amplamente durante o seu desenvolvimento tanto do ponto de vista macroscópico quanto microscópico, podendo haver várias classificações para este órgão (SCHRÖDER, 1995).

É interessante ressaltar que em várias espécies de mamíferos, observa-se o desenvolvimento de uma placenta vitelina precedendo a formação da placenta corioalantoide ou principal. Em roedores os dois tipos coexistem até o final da gestação, sendo a vitelina mais suscetível à síntese proteica e transferência de substâncias necessárias a nutrição histotrófica do que ao intercâmbio de gases respiratórios promovidos pela placenta principal (KING; ENDERS, 1970; ENDERS; CARTER, 2006; ENDERS, 2009).

Até certo tempo havia uma concepção de que a placenta vitelina de roedores era funcional apenas nos estágios iniciais da gestação ao passo que a corioalantoide atuava principalmente nos estágios tardios da mesma. No entanto, mediante novos estudos acerca dessa premissa, torna-se plausível considerar que os dois tipos de placenta se complementam na medida em que desempenham funções essenciais ao desenvolvimento do concepto (WISLOCKI et al., 1946; KING; ENDERS, 1970; MOSSMAN, 1987).

Independente do tipo de placenta, para a obtenção de respostas aos aspectos funcionais de cada uma, torna-se necessário a descrição morfofisiológica de tal órgão de modo a englobar: análises macroscópicas, microscópicas e ultraestrutura dos elementos que a compõe bem como das membranas fetais de forma a tornar esses mecanismos elucidativos.

6.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DA PLACENTA PRINCIPAL, ÚTERO E SACO VITELINO

A placenta corioalantoide de preás foi classificada como discoidal, sendo a face convexa associada ao feto e a côncava, em contato com os tecidos maternos. Em amostra obtida a fresco, observou-se coloração vermelha da placenta, refletindo elevado número de vasos maternos e fetais.

De forma análoga, Conceição et al. (2008) caracterizou a placenta principal de cutias (*Dasyprocta aguti*) e pacas (*Agouti paca*) como sendo em forma de cálice e apresentando cor vermelha em amostra obtida a fresco. A estrutura placentária nesses animais relacionava-se com a subplacenta centralmente e com a decídua basal lateralmente. Já Oliveira (2004) definiu o padrão macroscópico da placenta corioalantoide de mocós (*Kerondon rupestris*) como discoidal cujo formato placentário apresentou-se ligeiramente alongado no lado materno e levemente achatado no lado fetal.

O útero de preás a termo foi caracterizado como bicornuado cujos cornos uterinos apresentaram-se relativamente longos e delgados. A mucosa uterina esteve estreitamente associada com as membranas fetais e o feto, sendo este último envolto completamente pelo saco vitelino invertido. A vascularização vitelínica foi evidenciada como um conjunto de vasos dispostos a promover adequado suprimento sanguíneo para o feto. Resultados semelhantes no tocante ao formato uterino e vascularização vitelínica foram descritos por Egund e Carter (1974) ao caracterizarem o útero do porquinho da Índia por meio de método angiográfico.

6.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA PLACENTA CORIOALANTOIDE

Os resultados permitiram observar no preá, o início da organização da placenta corioalantoide a partir do décimo segundo dia de gestação, período que coincidia com o estabelecimento da cavidade amniótica e alongamento do blastocisto. Posteriormente,

verificou-se no vigésimo dia de gestação, elevado grau de organização e maturação da placenta principal.

Mess (2007) realizou estudo de placentação corioalantoide e vitelina na espécie *Petromus typicus* com o intuito de investigar a evolução histórica da placenta nos roedores histricognatis, utilizando para tal, técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os resultados demonstraram que na gestação inicial desenvolvia-se uma imatura placenta corioalantoide, situada no lado antimesometrial do útero. Áreas de espongiotrofoblasto desprovidas de vasos sanguíneos começavam a se organizar bem como a região do labirinto que por sua vez, apresentava vasos fetais e canais de sangue materno.

Fischer e Floyd (1972) por meio da microscopia de luz realizaram estudos de placentação no esquilo-da-Mongólia (*Meriones unguiculatus*) como forma de caracterizar a morfologia placentária nesta espécie. Verificaram que entre os dias 13 e 14 de gestação, uma imatura placenta corioalantoide surgia em decorrência da vascularização do cone ectoplacentário por vasos oriundos do mesoderma alantoidiano. Neste período, a organização do labirinto e sincício marginal não era evidente, ao passo que entre os dias 15 e 16 de gestação, observaram-se modificações das membranas fetais e expansões do embrião e placenta principal. Consequentemente, regiões do labirinto placentário e sincício marginal bem como os padrões vasculares das circulações maternas e fetais tornaram-se bem definidos, culminando com elevado grau de maturação placentária a partir do décimo nono dia de gestação.

6.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO BLASTOCISTO

O blastocisto de preás apresentou desenvolvimento inicial semelhante ao descrito por Cross em 1998 quando realizou trabalho sobre formação da placenta e membranas fetais em roedores. Desta forma, verificou-se rápido crescimento do blastocisto associado a modificações na forma, a qual mudou de oval para cilíndrica. Foi possível identificar em um dos polos deste blastocisto, células embrioblásticas envolvidas na posterior formação dos folhetos embrionários. No polo oposto, verificaram-se populações de células trofoblásticas

relacionadas ao surgimento do cone ectoplacentário. Além disso, a proliferação hipoblástica possibilitou o entendimento espacial da organização da cavidade do saco vitelino, fornecendo subsídios para uma melhor caracterização desta cavidade por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Mossman e Weisfeldt (1939) em trabalho envolvendo membranas fetais e desenvolvimento inicial do blastocisto em primitivo esquilo do gênero Sciuridae, verificaram a localização do blastocisto na câmara de implantação. No local onde este se inseria no útero, observaram-se células do trofoectoderma com formato colunar baixo e ausência de cílios.

De acordo com Enders e Schlafke (1967) o blastocisto de ratos que se desenvolve na gestação inicial apresentou trofoblasto mural dotado de complexos juncionais bem desenvolvidos, além de curtas e irregulares vilosidades na superfície livre deste epitélio.

Nos resultados descritos em preás, destacou-se a câmara de implantação por meio da microscopia eletrônica de varredura e verificou-se, com o auxilio da microscopia de luz, várias vilosidades apicais nas células trofoectodérmicas que constituíam o trofoblasto mural do blastocisto.

Desta forma, as informações obtidas no tocante ao desenvolvimento inicial do blastocisto em preás foram fundamentais para o entendimento da formação do saco vitelino e a sua posterior inversão.

6.4 A PLACENTA VITELÍNICA

A compreensão da organização estrutural da placenta vitelina ao longo do período gestacional favorece o estabelecimento de correlações com os aspectos funcionais do saco vitelino. Muitas pesquisas avaliam a estrutura fina das células endodérmicas viscerais e parietais no que diz respeito ao aparato absortivo bem como das organelas citoplasmáticas presentes neste epitélio. Este fato permite ressaltar importância de uma placenta vitelina invertida seja para aumentar a contínua demanda anabólica do embrião ou até mesmo como uma característica evolutiva das muitas espécies de roedores.

King e Enders (1970) admitiram a importância de um órgão placentário, no porquinho da Índia e em muitas outras espécies de roedores, para transferência de nutrientes ao feto, sendo os mecanismos de transporte de substâncias desencadeados por dois tipos de placentas, uma corioalantoide e outra denominada placenta vitelina invertida.

De fato, os aspectos complementares destas placentas foram destacados em estudos que avaliaram a absorção de alguns elementos indispensáveis ao desenvolvimento fetal. Dentre eles verificou-se que o saco vitelino atuava na captação e transporte de íons ferrosos (Fe^{2+}) da mesma forma que os íons cálcio (ca^{2+}) eram absorvidos e transferidos ao feto pelo labirinto da placenta corioalantoide (WISLOCKI et al., 1946).

Para Calarco e Moyer (1966) a placenta vitelina possui geralmente importância secundária, persistindo como estrutura acessória. No entanto, em muitas espécies de roedores, o saco vitelino apresenta contínuo desenvolvimento durante todo o período gestacional, envolve e protege o embrião além de funções nutritivas e hematopoiéticas.

Beckman et al. (1990) afirmam que o saco vitelino visceral constitui um importante órgão placentário em roedores, pois estabelece os primeiros mecanismos de intercâmbio nutricional antes da placenta corioalantoide se tornar desenvolvida. Mesmo após o estabelecimento desta última, as células do endoderma visceral permanecem funcionais durante toda a gestação, desencadeando diversas funções metabólicas, secretoras e imunológicas.

A formação da placenta vitelina inicia com a produção de uma vesícula cuja porção visceral é vascularizada pelo mesoderma subjacente e o segmento parietal apresenta-se em contato com o trofoblasto da decídua capsular (ENDERS, 2009).

Os termos placenta vitelina parietal e capsular foram introduzidos por Jollie (1990) ao descrever os constituintes do saco vitelino em roedores de laboratório. O primeiro refere-se ao endoderma parietal que reveste a superfície da placenta principal e o segundo, ao epitélio parietal que recobre o trofoblasto mural.

Anderson (1959) ao analisar a placenta vitelina de ratos com o auxilio da microscopia de luz, constatou que a partir do décimo primeiro dia de gestação o saco vitelino era bem desenvolvido, contrastando com a presença de imatura placenta corioalantoide. O autor destacou que a placenta vitelina era constituída inicialmente por duas membranas endodérmicas: uma visceral e outra parietal, delimitando a cavidade do saco vitelino. A

camada parietal que revestia a decídua capsular apoiava-se numa membrana hialina de Reichert e suas células endodérmicas demonstravam formato colunar baixo, além de curtas microvilosidades apicais. Na superfície do epitélio visceral e abaixo da membrana basal que sustentava este epitélio, verificaram-se curtas vilosidades e poucos vasos vitelínicos respectivamente.

Os resultados obtidos em preás, no presente trabalho, demonstraram comportamento similar aos descritos no parágrafo anterior nos períodos estudados antes da inversão do saco vitelino. É importante destacar que a disposição do epitélio visceral apresentou comportamento relativamente constante a partir do décimo quarto dia de gestação, sendo evidenciadas áreas de intensa formação vilosa cujo aspecto convoluto direcionava-se para o endoderma parietal da superfície da placenta principal. Já nos locais distais desta placenta, verificavam-se células prismáticas dotadas de poucas vilosidades, podendo ser caracterizadas como região lisa do endoderma visceral. Tais características estão de acordo com as observações produzidas por Sanson (1922) ao estudar o desenvolvimento placentário inicial na ratazana da água (*Arvicola microtus amphibius*); Wislocki et al. (1946) ao retratarem a placenta vitelina de roedores sobre a ótica imunohistoquímica; Anderson (1959) em trabalho sobre as barreiras placentárias em ratos no tocante a absorção de gamaglobulinas; Jollie (1990) ao ter promovido revisão sobre o desenvolvimento, morfologia e funções do saco vitelino em roedores de laboratório; Oliveira et al. (2008) ao analisarem a placentação corioalantoide em preás e Freyer e Renfree (2009) ao realizarem revisões acerca da ontogenia do saco vitelino nos mamíferos.

Em preás, a presença de moléculas de glicogênio e/ou substâncias glicoproteicas foram reveladas pela reação do P.A.S principalmente nos endodermas parietais e distais da placenta corioalantoide, endoderma visceral, membrana de Reichert e alguns locais na decídua parietal. Não foram observadas reações positivas para o P.A.S no sincício marginal da placenta principal.

Este padrão de positividade do P.A.S retratado anteriormente mostra-se compatível com aqueles descritos por Haar e Ackerman (1971) ao estudarem as mudanças ultraestruturais do saco vitelino em camundongos; Favaron et al. (2011) em trabalho de placentação em roedores da Subfamília Sigmodontinae no tocante a positividade do P.A.S das células endodérmicas viscerais. No entanto, nossos resultados divergem de Wislocki et al. (1946)

pelo fato destes autores afirmarem que não seriam encontradas moléculas de glicogênio nas células endodérmicas parietais que revestiam o trofoblasto mural e mesmo com as glicoproteínas presentes neste endoderma, as reações ao P.A.S seriam fracamente positivas.

Devido aos padrões de coloração promovidos pela reação positiva do P.A.S tanto nos elementos presentes na cavidade uterina quanto no saco vitelino, torna-se possível inferir a ocorrência de trocas de substâncias entre estes componentes, cuja mediação pode sofrer influência da membrana de Reichert (WISLOCKI; PADYKULA, 1953).

A partir do décimo segundo dia de gestação em preás, verificou-se a presença da membrana de Reichert que se encontrou interposta entre o endoderma parietal e o trofoblasto da placenta corioalantoide bem como entre o epitélio parietal e trofoblasto mural da decídua capsular. Por meio das microscopias eletrônicas de varredura e transmissão, esta membrana apresentou padrão de eletrodensidade moderada, resultante do aspecto fibrilar agregado que se distribuía de forma contínua ao longo do contorno desta lâmina basal.

Padrões semelhantes no tocante ao desenvolvimento desta membrana foram relatados por Jollie (1968) ao descrever as mudanças da estrutura fina do saco vitelino e membrana de Reichert em ratas com o aumento da idade gestacional. No entanto, o autor relatou que em todos os períodos analisados, as células endodérmicas parietais apresentaram aspecto cuboidal e eram frequentemente separadas uma das outras. Além disso, as células trofoblásticas em alguns locais apresentaram-se descontínuas, o que resultava na formação de fenestrações tanto do lado endodérmico quanto no lado trofoblástico. Como resultado, coexistiram muitas áreas em que a única barreira que separava substâncias presentes nos canais de sangue materno das células do endoderma parietal foi à membrana de Reichert a qual apresentou propriedades de membrana seletiva.

King (1971) com o propósito de caracterizar o contínuo desenvolvimento do endoderma parietal ao longo da gestação no porquinho da índia, verificou por meio da microscopia eletrônica de transmissão que entre os dias 28 e 30 de gestação as células parietais apresentavam grande quantidade de cisternas do retículo endoplasmático rugoso. Estas organelas celulares apresentaram-se dilatadas e continham em seu interior substâncias com aspecto denso cuja aparência era bastante similar a membrana de Reichert. Consequentemente, inferiu-se como uma das funções do endoderma parietal a síntese desta membrana basal.

É interessante ressaltar que aos 13 dias de gestação, um dos sacos gestacionais de preá apresentou-se destituído do trofoblasto mural e membrana de Reichert subjacente, sendo bem caracterizados os endodermas parietal e visceral da placenta vitelina. Apenas em determinadas regiões, evidenciaram-se as formações vilosas do endoderma visceral. Como argumentado anteriormente, este resultado proporcionou o estabelecimento de condições primordiais para consideração deste período como anterior a inversão do saco vitelino.

A partir do décimo quarto dia de gestação em preás, verificou-se o crescimento embrionário e da placenta principal, resultando em aproximações entre o endoderma visceral e parietal as margens da placenta corioalantoide. Para Cross (1998) esta interface entre os endodermas resulta das transformações e crescimento assimétrico do embrião, acarretando em mudanças espaciais do endoderma visceral e âmnio.

Nesta área de interface, as células endodérmicas apresentaram formato poliédrico, núcleos na posição basal e numerosas vilosidades na posição apical, demonstrando o aparato absortivo nesta região da placenta vitelina.

De acordo com Anderson (1959) imunoglobulinas marcadas com iodo radioativo (I^{131}) injetadas na veia jugular de ratas gestantes movia-se da luz uterina para a cavidade do saco vitelino na região de interface entre os endodermas visceral e parietal, sendo este mecanismo absortivo visualizado com o auxilio de método autorradiográfico.

Em preás as projeções vilosas do endoderma visceral, na região do disco placentário, tornaram-se mais ramificadas a partir do vigésimo quinto dia de gestação, conforme evidenciado pela microscopia de luz e eletrônica de varredura, sendo o alicerce das formações vilosas constituídos pela membrana basal visceral e serosa. Segundo Mossman (1987) estas ampliações dos processos digitiformes são decorrentes da inversão do saco vitelino, tornando as bordas apicais do epitélio visceral mais suscetível à captação de substâncias. Consequentemente, as vilosidades aumentam em número e tamanho, acompanhando o desenvolvimento das células viscerais as quais se tornam colunares altas (DEMPSEY, 1953; ANDERSON, 1959; KING; ENDERS, 1970).

Outros fatos que chamaram a atenção foram às diferenças na superfície celular das células endodérmicas viscerais do ponto de vista ultraestrutural pela microscopia eletrônica de varredura quando estas células foram avaliadas nas regiões próximas e distantes da placenta corioalantoide. Em situação proximal, verificaram-se numerosos prolongamentos

citoplasmáticos compatíveis com pseudópodes cuja dinâmica motora poderia refletir o desempenho funcional desta célula ao absorver, processar e eliminar resíduos de seu próprio metabolismo. Contrastando com esta característica, as porções distais revelaram células endodérmicas viscerais apresentando superfície externa altamente lisa.

Cockroft (1986) realizou um trabalho que também envolveu análises da superfície celular externa com ênfase nas formações pseudocíticas do endoderma em áreas peri-placentárias e distais. No entanto, o enfoque dado nesse experimento direcionou-se para as células endodérmicas parietais na superfície da placenta corioalantoide bem como revestindo o trofoblasto mural, em situação anterior a inversão do saco vitelino. Para atingir tal objetivo foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura além de gravações dos movimentos celulares em câmera acoplada a microscópio apropriado cuja velocidade de gravação era 64 vezes maior do que a passagem de tempo normal. Os resultados demonstraram o predomínio de pseudópodes e atividade motora nas células endodérmicas às margens do disco placentário ao passo que em regiões distais, as células possuíram superfície extremamente lisa e pouca motilidade.

As células endodérmicas parietais e viscerais em preás apresentaram intensa capacidade proliferativa, demonstrada pela reação positiva ao PCNA durante todo o período analisado o que vem a ratificar as afirmações de outros autores sobre o contínuo desenvolvimento deste epitélio ao longo da gestação.

Com relação à vascularização vitelínica, Haar e Ackerman (1971) afirmam que os processos de vasculogênese no estabelecimento da circulação vitelínica encontram-se diretamente relacionados ao desenvolvimento do endoderma visceral. Estes autores estudaram a estrutura fina deste endoderma associado ao início da circulação vitelina em camundongos com 8, 10 e 11 dias de gestação. Os resultados mostraram que durante a formação das células endoteliais, no oitavo dia de gestação, a membrana basal visceral sofria processos de fragmentação tornando-se ausente. Numerosos espaços intercelulares surgiam entre as células endodérmicas, resultantes do desaparecimento desmossômico e de complexos juncionais entre estas células. Posteriormente, a partir do décimo dia de gestação, eram formados canais vasculares, seguidos do completo restabelecimento da membrana basal visceral que se tornava interposta entre o endoderma e mesoderma subjacente.

De acordo com Jollie (1986) o endoderma visceral em ratas possui maior quantidade e desenvolvimento de capilares vitelínicos quando estes se localizam em regiões mais distais à placenta principal. Esta característica foi confirmada nos estudos com preás mediante os resultados obtidos pela macroscopia e microscopia eletrônica de varredura ao serem demonstrados que em locais próximos ao disco placentário, os vasos vitelínicos não eram abundantes, apresentaram-se retilíneos e distribuíram-se de forma paralela. Em situação oposta, verificou-se maior número de vasos vitelínicos, apresentando pontos de convergência vasculares que por sua vez ramificavam-se ao longo desta região.

Para o presente trabalho, tornou-se importante a caracterização destes vasos, pois refletiram o arranjo vascular destinado ao suprimento fetal por substâncias indispensáveis ao desenvolvimento do mesmo. Neste sentido, ressaltou-se ainda a intensa vascularização vitelínica pela marcação seletiva por meio da reação imunohistoquímica para vimentina além da microscopia eletrônica de transmissão. Este último método possibilitou evidenciar um vaso vitelínico desprovido de fenestrações diferindo, portanto, dos achados verificados por Carpenter e Ferm, 1969; King e Enders, 1970; Haar, 1977; Jollie, 1984 ao descreverem fenestrações nos vasos vitelínicos de hamsters (*Cricetus auratus*), porquinho da Índia, camundongos e roedores de laboratório, respectivamente.

O endoderma parietal em preás apresentou mudanças importantes durante o período em que foi analisado. Inicialmente aos 12 dias de gestação, foi constituído por células prismáticas ou cuboidais, contendo numerosos grânulos apicais positivos para a reação do P.A.S e elevada relação núcleo/citoplasma. Posteriormente, evidenciou-se aos 25 dias de gestação, aspecto pseudoestratificado do epitélio parietal com células de formato predominantemente colunar. Padrões semelhantes de desenvolvimento foram evidenciados por King (1971) ao analisar a diferenciação do endoderma parietal no porquinho da Índia, porém foi diferente da caracterização realizada por Jollie (1968). Segundo este autor, o endoderma parietal do rato ou camundongo mantém forma achatada ou esférica ao longo do período gestacional.

Dempsey (1953) demonstrou por meio da microscopia eletrônica de transmissão, a disposição das organelas citoplasmáticas do endoderma visceral, no porquinho da Índia, de modo a verificar as funções absortivas deste epitélio. De acordo com os resultados, o autor enfatizou a distribuição predominante das mitocôndrias em regiões perinucleares bem como a

riqueza de cisternas do retículo endoplasmático granular em posição infranuclear da célula. Da mesma forma, os resultados obtidos em preás corroboraram com os aspectos ultraestruturais verificados no cobaio, indicando que estas células apresentaram metabolismo ativo.

Segundo Jollie (1990) os espaços laterais entre as células endodérmicas viscerais, de roedores de laboratório, possuíam complexos juncionais e vilosidades direcionadas para a luz deste espaço. Na posição apical destas células, podiam ser observadas muitas vesículas e vacúolos de armazenamento, demonstrando um complexo sistema destinado à absorção, sendo estas observações verificadas também nas análises por microscopia eletrônica de transmissão em preás.

Todos os elementos estruturais observados nas células endodérmicas viscerais bem como a íntima relação entre este e o útero reforçam o argumento das vantagens para o organismo fetal promovido pela inversão do saco vitelino.

6.5 PARADIGMA DA INVERSÃO DO SACO VITELINO

De acordo com Stewart (1998) a reprodução em mamíferos representa um desafio para o sistema imune materno devido aos mecanismos que permitem o pleno desenvolvimento fetal, apesar de este último constituir componentes antigênicos em potencial.

Este paradigma reflete os mecanismos paradoxais que fazem com que o organismo materno evite a rejeição do concepto (DENKER, 1993). Dentre eles, podem-se citar a ausência da expressão de antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II (MHC II) por parte das células trofoblásticas as quais se limitam a sintetizarem moléculas incomuns do MHC Classe I, acarretando na expressão de moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) não típico (CROSS et al.,1994). Como resultado, já foi verificado que células do citotrofoblasto humano expressavam em sua membrana citoplasmática o Antígeno Leucocitário Humano tipo G (HLA-G) que por sua vez, protegia esta célula contra a ação das células “Natural Killer” (NK) produzidas pelo estroma endometrial (BURT et al., 1991). Associado a isto, citocinas produzidas pelo útero são capazes de favorecer o desenvolvimento

trofoblástico, como é o caso do Fator Estimulador de Colônia 1 (CSF-1) (PAMPFER et al., 1991).

Como a inversão do saco vitelino resulta na degeneração da onfalopleura bilaminar, acarretando na formação de interface entre o endoderma visceral e útero, torna-se intrigante quais os mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento do epitélio visceral pelo sistema imune materno de forma a não ocorrer reações imunogênicas desfavoráveis ao desenvolvimento embrionário. A elucidação dos mecanismos desta situação paradoxal irão solidificar as vantagens promovidas pela inversão do saco vitelino, mediante o aperfeiçoamento do aparato absortivo, já evidenciado nas relações anatômicas obtidas neste trabalho.

Para Mossman (1987), Mess (2003), roedores e lagomorfos retêm uma placenta vitelina ao longo da gestação, podendo a mesma sofrer inversão parcial ou total. Neste sentido, Beckman et al. (1990) argumentam que em ratos a inversão total do saco vitelino ocorre entre os dias 16 e 17 de gestação com a ruptura da membrana de Reichert e consequente aposição entre endoderma visceral e útero.

De acordo com Jollie (1968) a inversão em ratos acontece no dia 16 de gestação, iniciando com a ruptura da membrana de Reichert seguida de retrações da decídua capsular, produzindo ao final, confluência entre as cavidades vitelina e uterina. Perry (1981) retrata que durante a inversão no porquinho da Índia, ocorre degeneração da decídua capsular permitindo a absorção de substâncias das glândulas uterinas pelo endoderma visceral.

A utilização de histologia convencional associada a técnicas de microscopia eletrônica de transmissão possibilitaram a caracterização da placenta vitelina em coelhos. Os resultados evidenciaram que entre os dias 11 e 12 de gestação ocorria à degeneração do endoderma parietal e ectoderma, resultando na formação de uma placenta vitelina invertida. Consequentemente, verificou-se que a tensão promovida pelo fluído do celoma extraembrionário, fazia com que o endoderma visceral mantivesse estreita relação com a decídua parietal da região antimesometrial do útero (LARSEN, 1963).

Estudos de placentação em morcegos (*Noctilio labialis minor*) permitiram a identificação de três estruturas placentárias diferentes, desenvolvidas ao longo da gestação: a onfalopleura bilaminar, onfalopleura trilaminar e placenta corioalantoide. A primeira estrutura apresentou contato direto com o trofoblasto e decídua parietal, formando a placenta

coriovitelina. A segunda desenvolveu-se em consequência da invasão mesodérmica na primeira. Posteriormente, verificou-se que o segmento parietal persistia até o final da gestação, sendo a inversão referida como incompleta (ANDERSON; WINSATT, 1963).

Dempsey (1953) afirma que antes da inversão do saco vitelino, no porquinho da Índia, o endoderma visceral encontra-se em contato direto com o conteúdo da cavidade do saco vitelino e é suprido pelos vasos vitelínicos localizados abaixo da membrana basal visceral. Durante a inversão, a membrana de Reichert é a última a degenerar resultando ao final, em células endodérmicas diretamente expostas as secreções uterinas, podendo absorvê-las e transferi-las com maior efetividade ao embrião. Já Jollie (1990) afirma que nesta espécie, não é formado o segmento parietal da onfalopleura bilaminar, sendo a inversão constituída pela degeneração do trofoblasto mural logo após a implantação.

Jensh et al. (1977) realizaram estudos sobre as alterações morfológicas do saco vitelino parietal de ratas albinas Wistar no período de 12 a 19 de gestação. Com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, os autores caracterizaram as mudanças ocorridas no epitélio parietal e membrana de Reichert em situação anterior e durante a inversão do saco vitelino. Os resultados demonstraram que nos dias 12 até 14 de gestação, as células endodérmicas apresentaram forma oval, superfície externa lisa, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos. A inversão teve início no décimo quinto dia de gestação com o aumento da morte de células parietais por autólise, decorrente da dispersão ou condensação dos elementos nucleares da célula. Muitas projeções citoplasmáticas destas células penetraram na membrana de Reichert tornando-a descontínua e irregular. Nos dias 16 e 17 de gestação, o endoderma parietal apresentou progressiva evidência de degeneração com muitos espaços vesiculares no citoplasma e escassez de mitocôndrias e retículo endoplasmático granular. Finalmente, o décimo oitavo dia culminou com o colapso de todos os elementos que caracterizavam a onfalopleura bilaminar.

Os resultados por microscopia de luz obtidos em preás demonstraram, durante a inversão, desorganização estrutural do endoderma parietal e desaparecimento gradual da membrana de Reichert cujos mecanismos de degeneração podem ser similares aos verificados no parágrafo anterior. Infelizmente, não foi possível verificar o processo de inversão por meio da microscopia eletrônica de transmissão já que se tornou muito difícil verificar estas alterações no momento exato em que ocorreria. É importante ressaltar que existe a

possibilidade de variações no período da inversão, pois muitos fatores individuais podem contribuir para a cinética do desenvolvimento embrionário, acarretando, por sua vez, em alterações capazes de influenciar os mecanismos da inversão. No presente estudo, no entanto, verificou-se homogeneidade no tocante ao período de inversão conforme foi evidenciado nos três sacos gestacionais estudados no décimo quarto de dia de gestação.

Contrastando com as informações anteriormente citadas, Kanashiro (2011) realizou estudo sobre o destino das células trofoblásticas murais relacionadas à dinâmica da inversão do saco vitelino no porquinho da Índia. Para tanto, realizou cortes seriados dos fragmentos uterinos contendo sítios de implantação em diferentes fases de gestação. Em seguida, realizaram-se reações imunohistoquímicas para um painel de lectinas, sendo obtidas elevada especificidade da lectina ECL (*Erytrina cristagalli lectin*) para o trofoblasto mural. Os resultados demonstraram a reconstituição morfológica temporal e espacial do desenvolvimento embrionário inicial do cobaio na organização da placenta vitelina. A autora afirmou que as células trofoblásticas ECL positivas permaneceram revestindo a superfície da placenta vitelina, ao longo da gestação, de modo que o processo de inversão total não ocorreria.

No entanto, deve-se enfatizar que muitas pesquisas que correlacionaram às classificações placentárias baseadas na anatomia com os respectivos padrões filogenéticos, já estabeleceram de forma bem evidente que a inversão do saco vitelino representa uma convergência evolutiva, baseada em prévia condição ancestral. Estas informações contribuem para novos conhecimentos e classificações taxonômicas entre os mamíferos bem como na ordem Rodentia, o que favorece o estabelecimento de novos caminhos para os estudos de placentação.

7 CONCLUSÕES

Os principais resultados obtidos no presente trabalho forneceram os elementos necessários à conclusão, descritos a seguir:

1- Em gestação a termo, o saco vitelino apresentou-se como uma membrana ricamente vascularizada e de aspecto viloso que envolvia o feto em toda sua extensão.

2- Nos dias de 11 a 13 de gestação, observou-se o estabelecimento dos endodermas parietal e visceral, delimitando a cavidade do saco vitelino. O epitélio parietal apresentou-se revestindo tanto a superfície externa da placenta principal como o trofoblasto mural da decídua capsular. Já o endoderma visceral demonstrou poucas vilosidades.

3- A análise por microscopia de luz de um saco gestacional aos 13 dias de gestação permitiu caracterizar como condição primordial para uma situação anterior a inversão, a persistência de pelo menos um dentre os três elementos que compuseram a onfalopleura bilaminar.

4- A inversão do saco vitelino em preás ocorreu no décimo quarto dia de gestação, ratificado pela análise de três sacos gestacionais diferentes.

5- Após a inversão, o epitélio parietal que permaneceu ao longo da gestação foi aquele que revestia a superfície fetal da placenta corioalantoide. Além disto, houve aumento das vilosidades e vascularização do endoderma visceral, conforme se verificou pela microscopia eletrônica de varredura e reação imunohistoquímica para vimentina respectivamente.

6- A reação imunohistoquímica para PCNA demonstrou todo o potencial proliferativo das células endodérmicas parietais e viscerais.

7- Devido ao contínuo crescimento embrionário e da placenta principal, verificou-se o surgimento de importante área de interface entre os endodermas parietal e visceral, as margens da placenta corioalantoide.

8- A inversão do saco vitelino em preás representou uma disposição anatômica favorável às funções absortivas bem como ao desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. W. The Placental Barrier to Gamma-globulins in the Rat. **The American Journal of Anatomy**. v. 104, p. 403-429, 1959.

ANDERSON, J. W.; WINSATT, W. A. Placentation and Fetal Membranes of the Central American Noctilionid Bat, *Noctilio labialis minor*. **The American Journal of Anatomy**. v. 112, n. 2, p.181-201, 1963.

BECKMAN, D. A.; KOSZALKA, T. R.; JENSEN, M.; BRENT, R. L. Experimental Manipulation of the Rodent Visceral Yolk Sac. **Teratology**. v. 41, p. 395-404, 1990.

BECKMAN, D. A.; BRENT, R. L.; LIOYD, J. B. Sources of amino acids for protein synthesis during early organogenesis in the rat. 4. Mechanisms before envelopment of the embryo by the yolk sac. **Placenta**, v. 17, p. 635-641, 1996.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos.** Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120p.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle de roedores**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002. 132p.

BROSENS, I.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **Journal Pathology and Bacteriology**. v. 93, n. 2, p. 569-579, 1967.

BURT, D.; JOHNSTON, T.; WIT, T. R.; ELSEN, P. VAN DEN.; STERN, P. L. Cellular and Molecular Biology of the Maternofetal Relationship. **International Journal of Gynecological Cancer**. v. 117, n. 6, p. 21-29, 1991.

CADEMARTORI, C. V.; MARQUES, R. V.; PACHECO, S. M. Estratificação vertical no uso do espaço por pequenos mamíferos (Rodentia, Sigmodontinae) em área de Floresta Ombrófila Mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 10, n. 3, p. 187-194, 2008.

CALARCO, P. G.; MOYER, F. H. Structural changes in the murine yolk sac during gestation: Cytochemical and electron microscope observations. **Journal of Morphology**. v. 119, p. 341-357, 1966.

CARPENTER, C. C.; FERM, V. M. Uptake and storage of trophoblast by the rodent yolk-sac placenta: An electron microscopic study. **The American Journal of Anatomy**. v. 125, p. 429-256, 1969.

CARTER, A. M. Evolution of the Placenta and Fetal Membranes Seen in the Light of Molecular Phylogenetics. **Placenta**. v. 22, p. 800-807, 2001.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; OKELO-ODUOR, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Animal Reproduction Science**. v. 82-83, p. 35-48, 2004.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; JONES, C. J. P.; MESS, A.; PFARRER, C.; PIJNENBORG, R.; SOMA, H. Comparative Placentation and Animal Models: Patterns of Trophoblast Invasion – A Workshop Report. **Placenta**. v. 27, p. s31-s33, 2006.

CARTER, A. M. Animal models of human placentation – A review. **Placenta**. v. 21, p.41-47, 2007.

CHANG, S. T; WONG, P. Y. **The Journal of Physiology**. v. 279, p. 385-394, 1978.

CLARK, C. C.; TOMICHEK, E. A.; KOSZALKA, T. R.; MINOR, R. R.; KEFALIDES, N. A. The role of the parietal endoderm in the biosynthesis of basement membrane collagen and glycoprotein *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, n. 13, p. 5259-5267, 1975.

COCKROFT, D. L. Regional and temporal diferences in the parietal endoderm of the midgestation mouse embryo. **Journal of Anatomy**. v. 145 , p. 35-47, 1986.

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. 5, n. 28, p. 253-259, 2008.

CRESPI; SEMENIUK, C. Parent-offspring conflict in the evolution of vertebrate reproductive mode. **The American Naturalist**. v. 163, n. 5, 2004.

CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. **Science**. v. 266, p. 1508-1518, 1994.

CROSS, J. C. Formation of the Placenta and Extraembryonic Membranes. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 857, p. 23-32, 1998.

CROSS, J. C.; BACZYK, D.; DOBRIC, N.; HEMBERGER, M.; HUGHES, M.; SIMMONS, D. G.; YAMAMOTO, H.; KINGDOM, J. C. P. Genes, Development and Evolution of the Placenta. **Placenta**. v. 24, p. 123-130, 2003.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of The Guinea Pig: An Electron Microscopic Study. **The American Journal of Anatomy**. v. 95, p. 311-324, 1961.

DEMPSEY, E. W. Electron Microscopy of the Visceral Yolk-Sac Epithelium of the Guinea Pig. **American Journal of Anatomy**. v. 93, n. 3, p. 331-363, 1953.

DENKER, H. W. Implantation: A Cell Biological Paradox. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 266, p. 541-588, 1993.

EGUND, N.; CARTER, A. M. Uterine and Placental Circulation in the Guinea-pig: an Angiographic Study. **Fecundation Reproduction Fertility**. v. 40, n. 2, p. 401-410, 1974.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. A Morphological Analysis of the Early Implantation Stages in the Rat. **American Journal of Anatomy**. v. 120, n. 2. p. 185-225, 1967.

ENDERS, A. C. Current Topic: Structural Responses of the Primate Endometrium to Implantation. **Placenta**. v. 12, p. 309-325, 1991.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. S. Morphological Variation in the Interhemal Areas of Chorioallantoic Placentae. **Trophoblast Research**. v. 12, p.1-19, 1998.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N. Comparative placental structure. **Advanced drug delivery reviews**. v. 38, p. 3-15, 1999.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. Comparative Placentation: Some interesting Modifications for Histotrophic Nutrition – A Review. **Placenta**. v. 27, p. 11-16, 2006.

ENDERS, A. C. Reasons for Diversity of Placental Structure. **Placenta**. v. 23, p. s15-s18, 2009.

FAVARON, P. O; CARTER, A. M.; AMBRÓSIO, C. E.; MORINI, A. C.; MESS, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 9, p. 1-14, 2011.

FISCHER, V. T.; FLOYD, A. D. Placental Development in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguilatus*). **The American Journal of Anatomy**. v. 134, p. 321-336, 1972.

FREYER, C.; RENFREE, M. B. The Mammalian Yolk Sac Placenta. **Journal of Experimental Zoology (MOL DEV EVOL)**. v. 312B, p. 545-554, 2009.

GEORGIADES, A. C.; SMITH, F.; BURTON, G. J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**. v. 23, p. 3-19, 2002.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003. 956p.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. A Phase and Electron Microscopic Study of Vasculogenesis and Erythropoiesis in the Yolk Sac of the Mouse. **Anatomy Research**. v. 170, p. 199-224, 1970.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. Ultrastructural Changes in Mouse Yolk Sac Associated with Initiation of Vitelline Circulation. **The Anatomical Record**. v. 170, n. 4. p. 437-455, 1971.

HAAR, J. L. An *in vitro* Morphological Study of the Mouse Visceral Yolk Sac and Possible Yolk Sac Immunocyte Precursors. **Cell and Tissue Research**. v. 184, p. 113-119, 1977.

JENSH, R. P.; KOSZALKA, T. R.; JENSEN, M.; BIDDLE, L.; BRENT, R. L. Morphological alterations in the parietal yolk-sac of the rat from the 12th to the 19th day of gestation. **Journal of Embryology and Morphology**. v. 39, p. 9-21, 1977.

JOLLIE, W. P. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestacional age. **The American Journal of Anatomy**. v. 122, p. 513-532, 1968.

JOLLIE, W. P. Changes in the Fine Structure of Rat Visceral Yolk-Sac Placenta During Prolonged Pregnancy. **The American Journal of Anatomy**. v. 171, n. 1, p.1-14, 1984.

JOLLIE, W. P. Review Article: Ultrastructural Studies of Protein Transfer across Rodent Yolk Sac. **Placenta**. v. 7, p. 263-281, 1986.

JOLLIE, W. P. Development, Morphology, and Function of the Yolk-Sac Placenta of Laboratory Rodents. **Teratology**. v. 41, p. 361-381, 1990.

KANASHIRO, C. **Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface maternofetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida**. 2011. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KAUFMANN, P. The Guinea Pig Placenta and its Development. **Zentralblatt Anatomie**. v. 120, p. 83-101, 1969.

KING, B. F.; ENDERS, A. C. The Fine Structure of the Guinea Pig Visceral Yolk Sac Placenta. **American Journal of Anatomy.** v. 127, n. 4, p. 397-413, 1970.

KING, B. F. Differentiation of Parietal Endoderm Cells of the Guinea Pig Yolk Sac, with Particular Reference to the Development of Endoplasmic Reticulum. **Developmental Biology**. v. 26, p. 547-559, 1971.

KING, B. F. A Freeze-Fracture Study of the Guinea Pig Yolk Sac Epithelium. **The Anatomical Record**. v. 202, p. 221-230, 1982.

KING, B. F. Comparative studies of structures and function in mammalian placentas with special reference to maternal-fetal transfer of iron. **American Zoology**. v. 32, p. 331-342, 1992.

LAMBSON, R. O. An Electron Microscopic Visualization of Transport Across Rat Visceral Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy**. v. 118, p. 21-52, 1966.

LARSEN, J. F. Histology and Fine Structure of the Avascular and Vascular Yolk-sac Placentae and the Obplacental Giant Cells in the Rabbit. **The American Journal of Anatomy**. v. 112, n. 2, p. 269-283, 1963.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**. v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

MESS, A. Evolutionary Transformations of Chorioallantoic Placental Characters in Rodentia With Special Reference to Histricognath Species. **Journal of Experimental Zoology**. v. 299, p. 78-98, 2003.

MESS, A.; CARTER, A. M. Evolutionary Transformations of Fetal Membrane Characters in Eutheria with Special Reference to Afrotheria. **Journal of Experimental Zoology**. v. 306, p. 1-24, 2006.

MESS, A.; CARTER, A. M. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular & Integrative Physiology**. v. 148, n. 4, p.769-779, 2007.

MESS, A. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in the Dassie Rat *Petromus typicus* and its Significance for the Evolution of Hystricognath Rodents. **Placenta.** v. 28, p. 1229-1233, 2007.

MIGLINO, M. A.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; BONATELLI, M.; MACHADO, M. R. 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.

MOOJEN, J. **Os Roedores do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério de Educação e Saúde. Instituto Nacional do Livro; Biblioteca Científica Brasileira, (Série A, v.2), 1952. 214p.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of fetal membranes and accessory uterine structures. **Contribution to Embryology of Carnegie Institute Washington**. v. 26, p. 126-146, 1937.

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

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**: Comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance: basic functions; research opportunities. London: The Macmillan Press, 1987. 383p.

NAHON, J. L.; VENETIANER, A.; SALA-TREPAT, J. M. Specific sets of DNase I-hypertensive sites are associated with the potential and overt expression of the rat albumin and alpha-fetoprotein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 2135-2139, 1987.

NODEN, D. N.; de LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals. Developmental mechanisms and malformations**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985. 367p.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocós, *Kerodon rupestris*. Wied, 1820**. 2004. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, M. F.; CARTER, A. M.; BONATELLI, M.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Placentation in the Rock Cavy, *Kerondon rupestres* (Wied). **Placenta**. v. 27, p. 87-97, 2006.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBROSIO, C. E.; DANTAS, C. A. G.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic Placentation in Galea spixii (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 6, p. 1-8**,** 2008.

PAMPFER, S.; TABIBZADEH , S.; CHUAN, F-C.; POLLARD, J. W. Molecular cloning of a novel transcript for colony stimulating factor-1 from human endometrial glands. Production of a transmembrane form of the protein. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 5, p. 1931-1938, 1991.

PENTŠUK, N.; VANDER LAAN, J. W. An Interspecies Comparison of Placental Antibody Transfer: New Insights into Developmental Toxicity Testing of Monoclonal Antibodies. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 86, p. 328-344, 2009.

PERCEQUILO, A. R.; SANTOS, K. R. P.; CAMPOS, B. A. T. P.; SANTOS, R. G.; TOLEDO, G. A. C.; LANGGUTH, A. Mamíferos dos remanescentes florestais de João Pessoa, Paraíba. **Biologia Geral e Experimental**. v. 7, n. 2, p. 17-31, 2007.

PERRY, J. S. The mammalian fetal membranes. **Journals of Reproduction & Fertility Ltd.** v. 62, n. 2, p. 321-335, 1981.

PLONNÉ, D.; STACKE, A.; WEBER, K. U.; ENDISCH, U.; DARGEL, R. The pattern of apolipoprotein B100 containing lipoprotein subclasses produced by the isolated visceral rat yolk sac depends on developmental stage and fatty acid availability. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1299, n. 54, 1996.

SANSOM, G. S. Early Development and Placentation in *Arvicola* (*Microtus*) *Amphibius*, with Special Reference to the Origin of Placental Giant Cells. **Journal of Anatomy**. v. 56, p. 333-365, 1922.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 145-160, 2000.

SCHLÜTER, G. Ultrastructural Changes of the Early Visceral Yolk Sac Layer of Mouse Embryos after Maternal Injection of Trypan Blue. **Anatomy and Embryology**. v. 153, p. 287-293, 1978.

SCHNEIDER, H. Ontogenic changes in the nutritive function of the placenta**. Placenta**. v.17, n.1, p.15-26, 1996.

SCHRÖDER, J. H. Comparative aspects of placental exchange functions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 63, p. 81-90, 1995.

STARCK, D. Ontogenie und Entwicklungsphysiologie der Säugetiere. **Handbuch der Zoologie**. v. 8, p. 11-27, 1959.

STEWART, I. J. Granulated metrial gland cells in 'minor' species. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 40, p. 129-146, 1998.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHEMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 241p.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Johns Hopkins University Press, 2005. 2141p.

WISLOCKI, G. B.; DEANE, W.; DEMPSEY, E. W. The histochemistry of the rodent's placenta. **The American Journal of Anatomy**. v. 78, p. 281-347, 1946.

WISLOCKI, G. B.; PADYKULA, H. A. Reichert's Membrane and Yolk Sac of the rat investigated by Histochemical means. **American Journal of Anatomy**. v. 92, p. 117-151, 1953.

WOLFF, J. O.; SHERMAN, P. W. **Rodent Societies: An Ecological Evolutionary Perspective**. 1. ed. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. 610p.

WOOLLETT, L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 82, p. 1155-1161, 2005.