CLAUDIA KANASHIRO

**Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas
na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na
elucidação da organização da placenta vitelina invertida**

São Paulo

2011

CLAUDIA KANASHIRO

**Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas
na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na
elucidação da organização da placenta vitelina invertida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento: Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profº Drº Áureo T. Yamada

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

2426
FMVZ

Kanashiro, Claudia

Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida / Claudia Kanashiro. -- 2011.
122 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Áureo T. Yamada.

1. Placenta Vitelina. 2. Embrogenese. 3. Trofoblasto. 4. Cavia Porcellus. 5. Citoquímica Lectina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Claudia Kanashiro

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto protocolado sob o número 1950/2010, intitulado: "Avaliação da dinâmica das interações celulares na interface materno-fetal do sítio gestante do cobaio", no qual foram utilizados 30 guinea-pigs, adquiridos em biotério comercial, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Áureo T. Yamada, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KANASHIRO, Claudia

Título: Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais: Seiji e Tokiye que sempre me estimularam e me deram condições para eu estar aqui neste momento.

Aos meus irmãos Emerson e Marcelo que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando sempre.

A eles sou eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da FMVZ-USP, por possibilidade de realização de meu doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia, IB-UNICAMP, pela disponibilidade de equipamentos e materiais para a realização deste trabalho.

Ao meu mestre Áureo T. Yamada, um exemplo de homem digno, honesto, correto, humano, ético, e acima de tudo amigo. Sua compreensão, ensinamentos, dedicação, solidariedade e honestidade o fazem mais ser humano do que qualquer “currículo lattes” encorpado. Obrigado por me aceitar como seu discípulo e por contribuir em minha formação como pesquisador e como pessoa nestes 4 anos de convivência.

A Dra. Maria Angélica Miglino que me acolheu com muito carinho, orientou, ensinou e me ajudou alcançar o meu destino final.

Aos membros que participaram de minha qualificação: Profa. Dra. Márcia Cristina Bizinoto e ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury pela contribuição científica e valiosas sugestões para a finalização deste trabalho.

A todos técnicos, professores, bibliotecários, secretários que participaram de alguma forma na minha formação intelectual, agradeço não somente pela ajuda e incentivo, mas também pela amizade, amparo e confiança.

Agradeço a todos os amigos e companheiros de pós-graduação por compartilharem bem de perto a minha vida, pelas conversas, risadas, almoços... Muito obrigada pela amizade e pelo companheirismo.

A TODOS VOCÊS MEU MUITO OBRIGADO!!!!

RESUMO

KANASHIRO, C. **Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida.** [Analysis of the dynamic of origin and fate of trophoblast cells in the maternal-fetal interface of pregnant guinea pig uterus to elucidate inverted yolk sac organization]. 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A implantação embrionária e a placentação em cobaias são caracterizadas pela presença trofoblastos que se destacam da placenta principal, semelhantes ao trofoblasto extra-viloso de humanos. Nestes animais ultrapassam os limites, e podem ser encontrados infiltrados no profundamente no endométrio e no em ambiente externo ultrapassando aos limites da parede uterina. A cobaia desenvolve uma importante estrutura fisiológica de troca materno-embrionária, denominada de placenta vitelina invertida, definidas como membrana fetal destituída parcial ou totalmente do revestimento trofoblástico que permite a exposição do endoderma extra-embrionário em contato direto com o tecido materno. Tais características denotam um mecanismo de controle da resposta imune materna distinta dos paradigmas estabelecidos na reprodução humana e de roedores, assim como ratos e camundongos. Sendo a mais intrigante, a destituição do trofoblasto como célula da interface-materno-fetal que controla a tolerância imune-materna. No presente trabalho, procurou-se estabelecer a organização da placenta vitelina de cobaias a partir da identificação das células que compõe esta membrana extra-embrionária e identificar em que momento ocorre à remoção das células trofoblásticas, e a subsequente forma de interação das células da placenta vitelina na interface com o tecido materno. Para tanto foram utilizados cobaias fêmeas com idade gestacional conhecida, sacrificadas para coleta de segmentos uterinos nos períodos iniciais da gestação e destinados ao processamento histotógico de embebição em parafina. Na ausência de marcadores celulares específicos conhecidos para cobaias, foram realizados testes prospectivos com reações: citoquímicas de PAS e azul de toluidina (AT; um painel de lectinas biotinadas com afinidade específica para diferentes açúcares; e imunocitoquímica para citoqueratina. As reações realizadas com PAS e AT não identificaram populações celulares com marcação seletiva. Contudo dentre as lectinas tetadas, a *Erythrina cristagalli lectin* (ECL) apresentou reação altamente seletiva para a população de trofoblasto mural (TM) que se origina do trofotoderma, mantendo esta reatividade ao longo da gestação. Esta marcação permitiu avaliar temporal e espacialmente o destino destas células que ao longo da gestação eram mantidas como monocamada de TM revestindo externamente a placenta vitelina e, portanto, não expondo as células do endoderma parietal ou visceral ao

tecido materno. Pelo acompanhamento do desenvolvimento embrionário nos cortes seriados, foi constatada no interior do blastocisto a organização de duas massas celulares internas em pólos opostos desde a fase de pré-eclosão. Uma das massas celulares constituída de embrioblastos que dará origem aos os folhetos embrionários nas fases subseqüentes, enquanto a outra formada as células tronco trofoblásticas precursora do cone ectoplacentário (CE). A cavidade da blastocele que separa estas duas massas celulares tem a sua parede revestida pelo endoderma parietal em fase tardia, após a formação da cavidade amniótica. Estes achados demonstram a peculiaridade da embriogênese no cobaio, diferente daquelas descritas para humanos e outros roedores, não permitem analogias diretas, o que pode ter contribuído para o equívoco na descrição clássica da organização e constituição da placenta vitelina invertida de constituição córion-amniótica. Isto é, o trofoblasto participa da organização da placenta vitelina inicial e permanece na membrana âmnion-córion-vitelina perfazendo todo o limite do embrião ao longo da gestação. Portanto a hipótese da placenta vitelina parcial ou totalmente invertida baseada na descrição clássica em cobaios é decorrente da interpretação equivocada da embriogênese destes animais.

Palavras-chave: Placenta Vitelina. Embriogênese. Trofoblasto. Cobaio (*Cavia Porcellus*).
Citoquímica e Lectina

ABSTRACT

KANASHIRO, C. **Analysis of the dynamic of origin and fate of trophoblast cells in the maternal-fetal interface of pregnant guinea pig uterus to elucidate inverted yolk sac organization** [Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida]. 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The guinea pig embryo implantation and placentation is characterized by trophoblast cells detaching from the main placenta in a similar way of human extra-villous trophoblasts that deeply intrude inside the endometrium and sometimes also found outside the uterine wall. Furthermore, this animal also develops inverted yolk sac placenta defined as fetal membrane partially or fully devoided of trophoblast sheet that allows extra-embryonic endoderm direct exposition to the maternal environment. These characteristics denote a distinct control mechanism of maternal immune response from the established paradigm for human and rodents (rat and mouse) reproduction, being most intriguing the depriving of trophoblast as cells of maternal-fetal interface regulating the maternal immune tolerance. The present work aimed to establish the organization of guinea pig yolk sac based on identification of cell populations composing this membrane and identification if, or, when the trophoblast cells are removed from and subsequent interaction way of yolk sac cell in interface with maternal tissue. It was used pregnant guinea pig sacrificed on established gestational day to collect uterine fragments on early pregnancy stage and processed by conventional paraffin embedding. Due to absence of known specific cell markers for guinea pig, was performed the prospective evaluation using PAS and toluidine blue (TB) cytochemistry and a screening using a panel of biotinylated lectin specific for different sugars and, anti-cytokeratin. The PAS and TB staining did not identify any specific cell population, however, among the lectins used, *Erythrina cristagalli lectin* (ECL) showed high selective labeling to the trophoblast cells originated from the trophoblast that was kept through the gestational period. This reaction pattern was useful to evaluate chronologically and topologically the fate of this cell and confirmed the constancy of these cells layering the yolk sac placenta in contact with maternal tissue and therefore, endodermal cells were not exposed to maternal environment. Evaluation of embryo development step by step in the serial sections showed the presence of two inner cell mass in opposite sites inside the pre-hatched blastocyst. One of this, was formed with embryoblast that latter will originate the embryonic sheets and the other formed with trophoblast stem cells (ST) will originate the ectoplacental-cone. The wall of blastocoele cavity separate these two inner cell mass was initially covered by a single ECL positive mural trophoblast and only later after the amniotic cavity is formed the extraembryonic endodermal

cells migrate from the embryonic sheets to cover internally the blastocoele cavity to organize the yolk sac placenta. These findings show the peculiarity of guinea pig embryogenesis, quite different from those described for human and rodents and therefore, does not allow direct analogy and seems to contribute in the misunderstanding of classic description of inverted yolk sac placenta and its cellular organization. It means, the trophoblast cell participates in the early organization of yolk sac placenta and remains in chorioamniotic yolk sac fetal membrane constantly limiting the embryo surface in contact with maternal environment. Therefore, the hypothesis of complete or partially inverted yolk sac placenta seems to be a miss understanding of guinea pig embryogenesis.

Key words: Yolk sac placenta. Embryogenesis. Trophoblast. Guinea pig (*Cavia porcellus*).
Lectin cytochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAS	ácido periódico -schiff
BSA	albumina sérica bovina
Am	amnioblasto
AT	azul de Toluidina
CAm	cavidade amniótica
Bc	cavidade da blastocela
Nk	célula natural killer
uNK	célula natural killer uterina
DC	células dendríticas
CE	cone ectoplacentário
Dec	decídua
dg	dias de gestação
Emb	embrião
etanol a	etanol 100%
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
CSF-1	fator estimulante de colônia
LIF	fator inibidor de leucemia
HLA	human leukocyte antigen
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleucina
JL	lectina <i>Artocarpus intergrifolia</i>
DSL	lectina <i>Datura stramonium</i>
DBA	lectina <i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
ECL	lectina <i>Erythrina cristagalli</i>
GSL	lectina <i>Grifonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>
LEL	lectina <i>Lycopersicon esculentum</i>
SBA	lectina <i>Soybean agglutinin</i>
STL	lectina <i>Soybean agglutinin</i>
VVL	lectina <i>Vicia villosa</i>
Em	massa celular embrioblastica

TS	massa de células tronco trofoblásticas
µm	micrometro
ml	mililitro
M	molar
pCAm	pró-cavidade amniótica
TP-CE	prolongamento do cone ectoplacentário
região AM	região anti-mesometrial
região M	região mesometrial
PB	tampão fosfato
PBS	tampão fosfato salina
T	trofotoderma
TM	trofoblasto mural
ZP	zona pelúcida

LISTA DE QUADRO

QUADRO1	Relação das lecinas biotiniladas, sigla e seu açúcar	36
-	inibidor	

LISTA DE APÊNDICES

Figura 1 -	Esfregaço vaginal representativo do ciclo estral do cobaio.	86
Figura 2 -	Cobaia não gestante.	88
Figura 3 -	Reações citoquímicas de ácido periódico Shiff - PAS (A,B) e Azul de Toluidina – AT (C-H)	90
Figura 4 -	Fotomicrografias ilustrativas do padrão da reação citoquímica com um painel de lectinas reveladas pela peroxidase no útero de cobaia gestante.	92
Figura 5 -	Fotomicrografias ilustrativas do padrão da reação citoquímica com um painel de lectinas reveladas pela peroxidase no útero de cobaia gestante.	94
Figura 6 -	Fotomicrografias ilustrativas da reação imunocitoquímica para um painel de anti-citoqueratinas.	96
Figura 7 -	Útero no 6º dg	98
Figura 8 -	Útero no 7º dg	100
Figura 9 -	Útero no 8º dg	102
Figura 10 -	Útero no 9º dg	104
Figura 11 -	Útero no 10º dg	106
Figura 12 -	Sítio de implantação embrionária no 11º dg	108

Figura 13 -	Sítio de implantação embrionária no 11ºdg (A-F) com detalhes da área do cone ectoplacentário (CE) em desenvolvimento.	110
Figura 14 -	Útero no 12ºdg e 13ºdg. .	112
Figura 15 -	Cone ectoplacentário no 13ºdg.	114
Figura 16 -	A placenta vitelina.	116-117

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	ANIMAL	31
3.2	CICLO ESTRAL E ESTABELECIMENTO DA IDADE GESTACIONAL	31
3.2.1	Esfregaço vaginal	31
3.2.2	Coloração de Shorr	32
3.2.3	Coleta e processamento dos sítios uterinos	32
3.3	REAÇÕES CITOQUÍMICAS	34
3.3.1	Reação de PAS (ácido periódico -Schiff)	34
3.3.2	Azul de toluidina a 0,5% em pH 2,2	35
3.3.3	Reações citoquímicas com lectinas	35
3.4	REAÇÕES IMUNOCITOQUÍMICAS PARA CITOQUERATINA	37
4	RESULTADOS	38
4.1	CICLO ESTRAL E ESTABELECIMENTO DA IDADE GESTACIONAL	39
4.2	O AMBIENTE UTERINO NÃO GESTANTE	40

4.3	IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NA INTERFACE MATERNO-FETAL	41
4.3.1	Reação citoquímica de PAS	41
4.3.2	Reação citoquímica de Azul de Toluidina (AT)	41
4.3.3	Reação citoquímica de lectina	42
4.3.4	Reação imunocitoquímica para citoqueratinas	42
4.4	A DINÂMICA DA RESPOSTA ENDOMETRIAL E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO RELACIONADO COM A ORGANOGÊNESE DA PLACENTA VITELINA	43
4.4.1	6º dg	43
4.4.2	7º dg	44
4.4.3	8º dg	45
4.4.4	9º dg	47
4.4.5	10º dg	48
4.4.6	11º dg	51
4.4.7	12º dg	53
4.4.8	Após o 15º dg	56
5	DISCUSSÃO	57
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE - FIGURAS	85

1 INTRODUÇÃO

Em roedores e primatas, incluindo os humanos, o sucesso da implantação embrionária culmina com a consolidação da placentação do tipo hemocorial decorrente da invasão das células trofoblásticas que inicia com o rompimento da barreira do epitélio uterino, permitindo o íntimo contato com estroma endometrial e o leito vascular materno. Nestas espécies, a implantação resulta em uma placenta que se insere profundamente na parede uterina, na qual a interface materno-fetal tem de um lado, o trofoblasto de origem embrionária e do outro lado, o tecido materno representado pelas células do estroma uterino, endotélio vascular e células do sistema imune. Esta forma íntima de interação materno-fetal exige um complexo mecanismo de reconhecimento e controle do sistema imunológico materno (CLARCK; ARCH; CHAOUAT, 1999).

A cobaia tem sido amplamente adotada como animal experimental e os seus hábitos e ciclos reprodutivos muito bem estabelecidos (SPIEGEL, 1976). A receptividade ao acasalamento ocorre 15 horas após iniciar o estro (JANIAK, 1971; KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977) e de acordo com Pytler e Strasser (1925), o óvulo é fertilizado de 6 a 12 horas após o coito, e inicia a implantação (BISCHOFF, 1852; HENSEN, 1876, 1883; CREIGHTON, 1878; HERMANN; STOLPER, 1904, 1905; DISSE, 1905; AMOROSO, 1952) no útero 4-5 dias pós-coito como mórula ou blastocisto inicial. A zona pelúcida desaparece após 6-7 dias, quando ocorre implantação do blastocisto (ENDERS; SCHLAFKE, 1969) na região anti-mesometrial. Ao final do 7º dia no estroma endometrial verifica-se a reação decidual (GROSSER, 1909, 1927; AMOROSO, 1952). No 8º dia com o ectoderma cobrindo o saco vitelínico, pode ser diferenciado o cone ectoplacentário (DUVAL, 1891). A partir do 9º dia o lúmen uterino desaparece, entretanto inicia-se a formação de um novo lúmen na porção anti-mesometrial, enquanto na região mesometrial forma-se a placenta e a subplacenta.

A placenta da cobaia foi descrita inicialmente por Reichert's (1848), e inúmeros estudos posteriores foram decorrentes de sua semelhança com placenta humana, despertando particular interesse sobre a sua organização e fisiologia para fins

clínicos, farmacológicos e toxicológicos, entre outros. A placenta do tipo hemo-monocorial, corioalantóide da cobaia tem formato discóide, tendo na interface de trocas metabólicas entre o sangue materno e o fetal, a disposição do sinciciotrofoblasto em estrutura labiríntica organizado em lóbulos que são permeados pelo sangue materno (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977; MIGLINO et al., 2004). Na interface materno-fetal, observa-se um comportamento peculiar do citotrofoblasto que apresentam intensa capacidade invasiva, cujas frentes de invasão podem superar os limites dos tecidos uterinos, atingindo normalmente a cavidade peritoneal (NANAEV et al., 1995). Ao contrário do que se observa em ratos e camundongos, onde a frente invasiva das células trofoblásticas são contidas nos limites do estroma endometrial decidualizado. Apesar desta forma agressiva da invasividade dos trofoblastos em cobaia, o processo ou os mecanismos relacionados com esta invasão é pouco conhecido.

Os trofoblastos invasivos destes animais aparentemente têm origem na subplacenta, uma estrutura acessória da placenta específica dos roedores caviomorfos. A subplacenta da cobaia, originalmente descrita por Duval (1891) é definida como a área especializada da zona coriônica derivada da proliferação e do crescimento da escavação central ou mesoderma central da placenta cório-alantóide (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961a, 1961b; DAVIES; FISCHER; SCHLAFFER, 2000). Estrutura semelhante é encontrada também em outros roedores caviomorfos tais como a paca, cotia, capivara (MIGLINO et al., 2004) e supostamente a subplacenta constitui a fonte de células trofoblásticas que fazem a frente de invasão junto ao endométrio (BONATELLI et al., 2006).

A ocorrência de citotrofoblasto invasivo que se destaca do seu ponto de origem (subplacenta) penetrando no endométrio e invadindo os vasos sanguíneos maternos assemelha-se ao comportamento do citotrofoblasto extra-viloso da placenta humana (CITAÇÃO). Se de um lado é intrigante a alta capacidade invasiva das células trofoblásticas, é ainda mais intrigante a passividade do organismo materno em permitir esta invasão. Não há relatos na literatura sobre a caracterização das células trofoblásticas da placenta de cobaias quanto à expressão de antígenos MHC, porém, considerando a proximidade filogenética, estima-se que sejam semelhantes a de outros roedores, como ratos e camundongos (CITAÇÃO). Em camundongos, este perfil de expressão de MHC explica parcialmente a baixa incidência de células

efetoras da resposta imune adquirida, porém há a alta incidência das células uNK que provavelmente atuam no controle da invasividade das células trofoblásticas. Não há, contudo, qualquer relato ou estudos sobre a incidência, disposição ou participação de células leucocitárias ou imunomoduladoras na interface materno-fetal do ambiente uterino gestante em histricomorfos. FALTAM AS REFERENCIAS!!

O útero gestante dos animais com placentação do tipo hemocorial ou endoteliocorial é considerado um ambiente imuno-privilegiado, pelo fato do embrião que pode potencialmente expressar antígenos maternos e paternos ser comparável a um aloenxerto que se desenvolve com sucesso no interior de uma mucosa, sem induzir respostas imunes do tipo inata ou adquirida (CLARK; ARCK; CHAOUAT, 1999). A interação entre o conceito e o sistema imune materno na gestação normal destes animais restringe-se ao contato com as células trofoblásticas que perfazem o limite físico da interface materno-fetal do início ao término da gestação (HANSEN, 1997). Os mecanismos exatos que envolvem a tolerância materna a antígenos embrionários na gestação, não estão completamente compreendidos. Porém, a supressão da expressão de antígenos MHC I e II clássicos na superfície dos trofoblasto (KING et al., 1993; CROY, YU; KING, 1994; ELLIS, 1994; DAVIS; FISCHER; SCHLAFFER, 2000), seria determinante para não induzir a resposta imune adquirida no ambiente uterino. Em humanos, a expressão de moléculas HLA-G e HLA-E (correspondente ao MHC-I não clássico) pelas células trofoblásticas teria papel determinante no mecanismo central que controla o sucesso da implantação e placentação do embrião alogênico (LANIER, 1998; KING et al., 2000). De fato, no útero gestante, os linfócitos relacionados com a resposta imune adquirida, tais como, células T CD3⁺ (10%), linfócitos B (<5%) e macrófagos CD 14⁺ (10%) tornam se escassos tanto em roedores (LEE; CLARK, 1991), quanto em humanos (ATTWOOD; PARK, 1961; NELSON; HUGHES; SMITH, 1993). Porém, ocorre um acúmulo e predomínio de linfócitos com perfil de células NK CD-56⁺/CD16⁻ (80%) (GRECO; WIECZOREK; SACHDEV, 1992) em humanos (KING, 2000) e NK-DBA positivo (>80%) em camundongos (CROY et al., 1993; PAFFARO JR et al., 2003), sendo estas células Natural Killer do ambiente uterino (uNK) exclusivas da gestação.

As células Natural Killer (NK) atuam na resposta imune inata com destacada atividade citolítica e citotóxica contra células transformadas, tais como, células infectadas por vírus e células tumorais, lisando-as e/ou produzindo citocinas, como,

por exemplo, o IFN- γ , TNF- α (TRINCHIERI, 1989; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2002). A interação das células NK com outras populações celulares ocorre através de receptores de membrana, classificados como ativadores ou inibidores, dependendo se a atividade lítica é disparada ou não após a ligação ao receptor. Em camundongos, os principais receptores inibitórios são os Ly49 e CD94-NKG2, sendo expresso nas NK maduras, enquanto os receptores de ativação são: NKRP1A e NKRP1C (NK1.1), DX5, CD2, 2B4, CD69, Ly49D, Ly49H, NKp46 e NKG2D (CARAUX et al., 2006). Estas células apresentam grânulos com proteínas líticas (perforina e granzimas), cuja liberação está diretamente relacionada com a atividade citolítica (citação). As células NK no sangue circulante (cNK) compreendem cerca de 5 a 20% das leucócitos totais residentes no fígado, baço, sangue periférico e apresentam baixa frequência nos órgãos linfóides como linfonodo, timo e medula óssea (ANDONIOU; ANDREWS; DEGLI-ESPOSTI, 2006). A similitude entre as células NK uterinas (uNK) e as células NK circulante (cNK) de camundongos tem sido verificada através de imunofenotipagem, que comprovam as expressões de: asialo-GM1, Ly-49G2 (LGL-1), NK1.1, Thy-1, FcR, 4H12 e CD45 (MUKHTAR et al., 1989; REDLINE; LU, 1989; LINNEMEYER; HAMILTON, 1990; PARR et al., 1990). Porém, as uNK de humanos, são distintas das cNK pela expressão do CD56bright CD16dim e apresentam ausência de L-selectina e marcadores CD69 (KOOPMAN et al., 2004; WU et al., 2006) enquanto as cNK são CD56dim (CROY et al., 1993). Pela avaliação do perfil da expressão gênica, verificam-se diferenças na expressão de alguns genes (KOOPMAN; STEWART; McBEY, 2003).

Apesar dos extensos estudos objetivando compreender as razões que levam ao acúmulo destas células atuantes na resposta imune inata no ambiente uterino de roedores e humanos, os mecanismos envolvidos na migração, diferenciação e as funções exercidas por estas células na gestação são ainda pouco esclarecidos. Contudo, a alta incidência das células uNK durante a gravidez, e a sua localização estratégica próxima à placenta é indicativo da sua importância na interação materno-fetal e/ou como barreira protetora à ação de microorganismos. Quanto a este último, os estudos experimentais referentes a abortos causados por infecção utilizando-se camundongos, foram observadas inclusões da bactéria *Chlamydia psittaci* dentro das células uNK (SÁNCHEZ et al., 1996). No entanto não há relatos sobre a ação lítica das uNK sobre estas bactérias.

Por outro lado, o acúmulo de uNK (camundongos e humanos) nas regiões que se interpõem à invasão pelo trofoblasto na formação da placenta sugere que estas células teriam importante papel neste processo. Em camundongos, Stewart (1984) identificou a presença de células uNK em íntimo contato com o labirinto-trofoblasto com sinais de degeneração. Este autor sugeriu que as uNK poderiam estar auxiliando na destruição local de células trofoblásticas danificadas, evitando que estes pudessem ativar o sistema imune materno. No entanto, os estudos posteriores (STEWART; PEEL; WEBSTER, 1996) revelaram que a citotoxicidade das células uNK sobre o trofoblasto placentário mesmo "*in vitro*" é baixa e conseqüentemente, não promoveria o ataque ao embrião em desenvolvimento. Isto se deve ao fato de que as uNK expressam dentre os receptores inibitórios, aqueles que ligam-se ao MHC não clássicos (HLA-C, HLA-E e HFLA-G), expressos pelos trofoblastos. Esta ligação inibe a atividade lítica das uNK (HIBY et al., 1997; VERMA; KING; LOKE, 1997; KING et al., 2000).

As células uNK produzem inúmeras citocinas que atuam como moduladores da resposta imune, com ações peculiares na gestação (SCHÄFER-SOMI, 2003; WU et al., 2006). Exemplos de algumas citocinas produzidas pela uNK e que atuam na gestação são: IL-1, fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônia (CSF-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) (CROY et al., 1997). De acordo com Croy et al. (2003), a profusão de citocinas que as uNK podem produzir permite atribuir diversas funções para estas células na gestação, como por exemplo, atuando sobre as células do estroma decidualizado colaborando para o seu crescimento, além de desencadear eventos que culminam na modificação das artérias espiraladas durante o desenvolvimento normal da gestação. Experimentos realizados com camundongos mutantes imunodeficientes tais como SCID-/- (CROY; LINDER; YAGER, 2001) e RAG-/- (CROY et al., 2003), demonstram que as uNK não são imprescindíveis para a gestação. Porém, o IFN- γ produzido por estas células constitui um importante mediador para o desenvolvimento da placenta, manutenção da decídua e a modulação da angiogênese na interface materno-fetal (ASHKAR; CROY, 1999; CROY; LINDER; YAGER, 2001). As principais anomalias que podem ser observadas em camundongos depletados de uNK são: ausência de desenvolvimento do agregado linfóide mesometrial, hipocelularidade e edema de decídua basal e persistência de

células musculares lisas nas artérias espiraladas acompanhada de dilatação limitada da luz vascular assim como do crescimento dos vasos (GUIMOND; WANG; CROY, 1998; ASHKAR; CROY, 1999).

Constata-se, portanto que o sucesso da gestação envolve primariamente a interação entre a imunidade inata e a tolerância na decídua materna que é o local de contato entre mãe e feto (KÄMMERER et al., 2003). Neste sentido, à semelhança do que ocorre na pele e em outras mucosas, não se pode ignorar que no ambiente uterino também são encontradas células dendríticas (DC), uma população de células acessórias do sistema imune (BLOIS et al., 2004). Usualmente, as células dendríticas atuam como elementos chaves nas respostas imunes inata e adquiridas (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ASKELUND et al., 2004), regulando, por exemplo, a ativação de leucócitos T responsáveis pela resposta imune adquirida (LIANG et al., 2003; LOZA; PERUSSIA, 2004). Estas células dendríticas apresentam duas funções principais: a de atuar como célula apresentadora de antígenos e indução de tolerância periférica (LIANG et al., 2003).

Apesar da profusão de dados relacionados com a interação entre as células maternas e de origem fetal na interface materno-fetal durante a gestação, algumas questões cruciais não são totalmente esclarecido, dificultando particularmente a compreensão sobre as causas primárias que acometem as interrupções das gestações. Em humanos, assim como em outros animais, as perdas gestacionais atingem a proporção de 30 a 40% dos gestantes, com agravantes nos casos de abortos recorrentes de etiologia desconhecida (citações).

A dificuldade em se completar estes conhecimentos está na falta de modelos experimentais que permitam avaliar de forma específica os diversos mecanismos envolvendo a diversidade de células envolvidas e o dinamismo dos fenômenos numa rede de interação altamente complexa que ocorre na interface materno-fetal do ambiente uterino gestante. Experimentos estes que não são passíveis de serem realizados em humanos e nem sempre suficientes nos animais laboratoriais de maior uso como ratos e de camundongos.

Neste sentido, a cobaia ou guinea-pig (*Cavia porcellus*), um mamífero da ordem Rodentia, subordem Histicomorfos, família Caviidae, que desenvolve placentação

do tipo hemo-monocorial corioalantoidiano (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977), poderia ser adotado como um modelo experimental na biologia da reprodução. A estrutura e organização da placenta da cobaia foram amplamente estudadas (ENDERS, 1965; VOLLRATH, 1965; MÜLLER; FISCHER, 1968; KAUFMANN, 1969; DAVIDOFF; SCHIEBLER, 1970) devido às diversas semelhanças com a placenta humana e o uso extensivo destes animais como modelos experimentais em ensaios farmacológicos e toxicológicos.

Os caviomorfos apresentam placenta vitelina invertida (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977) que preconiza a ausência do revestimento trofoblástico (Esquema 1) e colocando em contato a membrana vitelina em contato com os tecidos endometriais (MOSSMAN, 1987). Esta exposição da membrana não-coriônica do feto em contato direto com o tecido materno na placentação hemo-corial é um paradigma que não coaduna com outro paradigma da imunologia da reprodução. Isto é a tolerância materna ao embrião/feto alogeneico é decorrente da supressão de antígenos MHC classe I e expressão de antígenos MHC II, não clássicos na superfície das células trofoblásticas (MOFFET-KING, 2002; MOFFET; LOKE, 2006). Em humanos estes mesmos antígenos denominados de HLA (human leukocyte antigen) classificados como HLA-G são dominantes nas células trofoblásticas que são reconhecidas pelas células uNK e modulam a resposta anti-inflamatória destas células na interface materno-fetal (MOFFET-KING, 2002). Desta forma, torna-se imprescindível revisar o desenvolvimento das membranas coriônicas e da placenta vitelina nestes animais que pode contribuir substancialmente na elucidação dos mecanismos de tolerância materna na imunologia da reprodução.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão plena dos diversos mecanismos relacionados tanto com o sucesso quanto com as interrupções da gestação despertam grandes interesses na área da medicina humana quanto na veterinária, que buscam meios e tecnologias de intervenções baseadas em conhecimentos cientificamente comprovados. No

entanto, esta busca esbarra em aspectos éticos e econômicos, nem sempre passíveis de serem superados.

O presente trabalho buscou utilizar um modelo clássico de experimentação animal, que não tem sido adequadamente explorada na área da biologia da reprodução, mas que pode trazer informações complementares importantes devido às algumas peculiaridades do comportamento das células citotrofoblásticas destes animais. A cobaia tem sido amplamente adotada como animal experimental e os seus hábitos e ciclos reprodutivos muito bem estabelecidos. A duração do ciclo estral da cobaia varia de 16 a 18 dias, sendo o estro detectado através da visualização da degradação da membrana vaginal (SPIEGEL, 1976), e tem duração em torno de 4 dias. Ao termino do estro ocorre o fechamento da membrana epitelial da vagina. A cópula ocorre 15 horas após iniciar o estro (JANIÁK, 1971; KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977). De acordo com Pytler e Strasser (1925), o oócito é fertilizado de 6 a 12 horas após o coito, e chega ao sítio de implantação (BISCHOFF, 1852; HENSEN, 1876, 1883; CREIGHTON, 1878; HERMANN; STOLPER, 1904, 1905; DISSE, 1905; AMOROSO, 1952) no útero 4-5 dias pós-cópula como mórula ou blastocisto inicial. A zona pelúcida desaparece após 6-7 dias, quando ocorre implantação do blastocisto Enders e Schlafke (1969) na região anti-mesometrial. Ao final do 7º dia no estroma endometrial verifica-se a reação decidual (GROSSER, 1909, 1927; AMOROSO, 1952). No 8º dia com o ectoderma cobrindo o saco vitelínico, pode ser diferenciado o cone ectoplacentário (DUVAL, 1891). A partir do 9º dia o lúmen uterino desaparece, entretanto inicia-se a formação de um novo lúmen na porção anti-mesometrial, enquanto na região mesometrial forma-se a placenta e a subplacenta.

O interesse deste trabalho concentra-se na interface endométrio-placenta-fetal, buscando inicialmente identificar e localizar as populações leucocitárias no endométrio, que se pressupõe terem características imunomoduladoras distintas daquelas conhecidas em camundongos e humanos devido ao diferencial do potencial invasivo das células citotrofoblásticas. Do nosso melhor conhecimento, não há ainda na literatura que descrevam estas células no útero gestante de cobaias ou mesmo de qualquer outro roedor histricomorfo. O estudo pormenorizado sobre as células imunomoduladoras e imunoefetoras no ambiente uterino destes animais

poderá trazer importantes informações que poderão preencher as lacunas de conhecimento acerca dos mecanismos da imunologia da reprodução nos mamíferos.

Neste propósito, cobaias fêmeas com período de gestação conhecido através do monitoramento da ruptura da membrana vaginal, que sinaliza a ocorrência da cópula, serão sacrificadas para coleta de amostras dos segmentos uterinos nos períodos iniciais correspondentes à implantação e desenvolvimento dos primórdios da placenta, com o intuito de estabelecer os limites da interface trofoblasto-endométrio identificar e localizar as principais populações leucocitárias neste ambiente.

Para tanto foi processados amostras dos segmentos uterinos para histoprocessamento com inclusão em parafina e congelamento para criocortes. A identificação das células leucocitárias será realizada através de métodos citoquímicos e imunocitoquímicos, paralelamente às observações da dinâmica das alterações morfológicas nesta interface materno-fetal.

Com as análises, pretende-se avaliar as semelhanças e diferenças que estes animais com células trofoblásticas altamente invasivas apresentam em relação a outros animais (camundongos e humanos) que apresentam trofoblastos menos invasivos.

OBJETIVOS

1 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos a seguir.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Identificar a origem da placenta vitelina e a sua organização ao longo do desenvolvimento embrionário;

2.2 OBJETIVO PARCIAIS

- Obtenção de embriões de idades gestacionais conhecidas;
- Citoquímica de lectina com marcadores específicos e/ou seletivos para a identificação de populações celulares da interface materno-embrionária;
- Obtenção de cortes seriados para a reconstrução do desenvolvimento embrionário, em especial a organogênese da placenta vitelina;
- Identificar e localizar a origem das células trofoblásticas murais;
- Reavaliar” a origem e organização da placenta vitelina invertida.

MATÉRIAS E MÉTODOS

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

A seguir serão descritos as metodologias para a execução da proposta em questão.

3.1 ANIMAL

Cobaias fêmeas virgens (*Cavia porcellus*) da linhagem Hartley com peso inicial de 300-350g fornecidos pelo Biotério Bem Te Vi, Itupeva, SP. Mantidos em gaiolas plásticas (90x60x30 cm), forradas com maravalha, com acesso à água e ração comercial “*ad libitum*”. Após 1 semana de ambientação foi introduzido um machos da mesma linhagem e de igual peso em cada grupo de 4 fêmeas para constituírem colônias.

As fêmeas gestantes foram mantidas nas colônias com os machos no biotério Bem-Te-Vi e transportados para o Departamento de Histologia e Embriologia, IB, UNICAMP somente na manhã do dia estabelecido, para o sacrifício padronizado entre 11:00 e 12:00 horas da manhã.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e analisado pela Comissão de Ética com numero de protocolo CEUAVET nº47/FMVZ/170619.

3.2 CICLO ESTRAL E ESTABELECIMENTO DA IDADE GESTACIONAL

3.2.1 Esfregaço vaginal

O ciclo estral e o início da gestação de cada uma das fêmeas foi monitorado diariamente através do esfregaço vaginal, obtido no horário das 7:00 às 8:00 horas da manhã, introduzindo cotonete umedecido em solução salina estéril na vagina e

transferido para a lâmina histológica previamente revestida com poli-L-lysina. . As lâminas com os esfregaços foram remetidas para o laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia, IB, UNICAMP para realização da coloração de Shorr. O monitoramento diário através do esfregaço vaginal de cada uma das fêmeas foi mantido até o dia do seu sacrifício.

3.2.2 Coloração de Shorr

As lâminas histológicas com esfregaço vaginal foram fixadas com solução de etanol PA e poli-etilenoglicol, na proporção de 1:10 durante 1 hora, em temperatura ambiente. Fez-se a reidratação em gradiente decrescente de etanol (PA, 95°, 80°, 70°) e água destilada durante 5 minutos em cada solução. As lâminas foram incubadas por 10 minutos em Hematoxilina de Harris e lavadas com água corrente seguida de água destilada. Em seguida, tratou-se com corante de Shorr (Biebrich Scarlett, Orange G, Fucsina ácida, e ácido glacial) sendo então lavadas com água destilada por 5 minutos. As lâminas foram transferidas para solução mordente (solução de ácido fosfotungstico e ácido fosfomolibidico) durante 5 minutos e lavou-se com água destilada. Em seguida as lâminas foram transferidas para o corante verde de luz onde permaneceu por 5 minutos, sendo então desidratado em gradiente crescente de etanol, diafinizados em xilol e montado entre lamínula com resina Entelan (Merck, Brasil). Os esfregaços vaginais foram analisados em microscopia de campo claro (Elipse 800, Nikon, USA), acoplado com câmara digital Cool Snap e programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) para documentação digital.

3.2.3 Coleta e processamento dos sítios uterinos

As idades gestacionais escolhidas para análises foram: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 22, 24, 25, 31, 39 e 56 dias de gestação (°dg) estabelecidos pelo monitoramento do esfregaço vaginal corados pelo método de Shorr.

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com anestesia composta de cloridrato de Ketamina (600 mg/kg, Vetbrands), cloridrato de xilazina 2% (80mg/kg , Vetbrands) e acepromazina 0,2% (6,6mg/kg, Vetbrands), de acordo com as recomendações de Mezadri et al. (2004). Os animais em anestesia profunda foram imobilizados em decúbito-dorsal, laparotomizados para constatação macroscópica da presença dos sítios de implantação embrionária nos cornos uterinos, seguida da toracotomia para acesso para perfusão via ventrículo esquerdo ou aorta abdominal com 50 ml de solução salina (3 minutos) seguida de 200 a 300 ml de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4 durante 15 minutos. O átrio direito foi seccionado para permitir a drenagem sanguínea e das soluções perfundidas.

Os cornos uterinos foram removidos e imersos na mesma solução fixadora para dissecação e os fragmentos uterinos contendo sítios de implantação ou desenvolvimento embrionário foram coletados. O processamento do material foi realizado pela técnica rotineira de embebição em parafina (Histosec, Merck, Brasil).

Os segmentos dos cornos uterinos do 6º ao 9º dg que não apresentam nódulos macroscopicamente distinguíveis dos foram processados para obtenção de cortes longitudinais. Enquanto sítios de implantação ou desenvolvimento embrionário nos períodos posteriores ao 10ºdg, foram processados para obtenção de cortes transversais em relação ao eixo do corno uterino.

Cortes seriados de 5 µm de espessura do material em parafina foram coletados em lâminas histológicas previamente tratadas com poli-L-lysina ou silanizadas, de acordo com os procedimentos rotineiros do Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do DHE, IB, UNICAMP conforme descrito por Croy et al. (2010). Este procedimento consiste em obter cortes seriados onde o primeiro corte é aderido alinhados no topo da lâmina 1, o segundo corte na lâmina 2 e assim sucessivamente até o décimo corte aderida na lâmina 10. O décimo primeiro corte é aderido na lâmina 1 abaixo do corte 1 e assim sucessivamente até o vigésimo corte na lâmina 10 seguindo pelo vigésimo primeiro corte na lâmina 1, alinhado abaixo do décimo primeiro corte, completando a série com o trigésimo corte na lâmina 10. Com este procedimento cada uma das lâminas contém 3 cortes com diferenças de 50 µm entre si e permite realizar diversas reações citoquímicas ou imunocitoquímicas em

lâminas subseqüentes permitindo ampliar as comparações qualitativas de uma mesma amostra. Neste experimento foram obtidas séries de 10 lâminas tanto quanto necessárias para completar a análise da totalidade da dimensão de um embrião em cada um dos dias gestacionais em estudo.

As lâminas 1 e 5 de cada uma das séries foram invariavelmente coradas foram pela técnica convencional de HE para análise histológica convencional e avaliação da preservação das amostras em estudo.

3.3 REAÇÕES CITOQUÍMICAS

A seguir as reações imunohistoquímicas

3.3.1 Reação de PAS (ácido periódico -Schiff)

As lâminas 2 das sequências contendo os cortes seriados de cada um dos dias de gestação processados foram desparafinizados, hidratados e submetidos à reação de PAS com e sem tratamento prévio com amilase 1% durante 1 hora à 37°C.

Após lavagem em água destilada, os cortes foram tratados com solução de ácido periódico (Sigma) a 1% durante 30 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagem em água destilada durante 5 minutos e tratamento com o reativo de Schiff durante 20 minutos à temperatura ambiente, tendo o cuidado de evitar a exposição excessiva de luz. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, e tratados com metabissulfito de sódio 5% (3x/2minutos), seguida de lavagem em água destilada. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harry's durante 1 minuto, lavados em água corrente e desidratados em gradiente crescente de etanol, diafinizados em xilol e montado entre lamínula com resina Entelan (Merck, Brasil). Como controle da reação de PAS, os cortes foram privados da oxidação com o ácido periódico a 1%.

3.3.2 Azul de toluidina a 0,5% em pH 2,2

As lâminas 7 das seqüências contendo os cortes seriados de cada um dos dias de gestação processados foram desparafinizados, hidratados e tratados com água acidificada (solução aquosa de ácido acético glacial a 0,5%) pH 2,2 durante 3 minutos, seguida do tratamento com solução de azul de toluidina a 0,5% em pH 2,2 durante 1 hora. Após remoção do excesso do corante com água destilada 5 minutos, os cortes foram submetidos à regressão progressiva da coloração com água acidificada (solução aquosa de ácido acético glacial a 0,5%) durante 3 minutos, e lavados em água destilada por 5 minutos, desidratados em gradiente crescentes de etanol, xilol e montado entre lâminulas com Entelan.

3.3.3 Reações citoquímicas com lectinas

Uma série específica de cortes seriados de 10 lâminas conforme descrito no item 1.3.3 das amostras uterinas no 12º, 15º e 22º dg foram preparadas para os testes com um painel de lectinas. Após análise prévia das lâminas 1 e 6 coradas pela hematoxilina e eosina, as séries 2, 4, 7 e 9 foram utilizadas para os testes com o painel de lectinas na reação citoquímica.

Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos à reação citoquímica com lectinas biotiniladas (Quadro 1) de acordo com o protocolo descrito por Paffaro Jr et al (2003). O procedimento consistiu bloqueio da peroxidase endógena pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (Merck, Brasil) 0,3% em tampão fosfato salina (PBS) 0,05M pH 7,4 durante 30 minutos, seguido de lavagem em PBS 0,05M pH 7,4. Tratamento com albumina sérica bovina (BSA type V, Sigma, St Louis, USA) 0,1% em tampão fosfato (PB) 0,1M pH 7,4 durante 1 hora à temperatura ambiente. Incubação com lectina biotinilada diluída em PB 0,1M pH 7,4 contendo BSA 0,1% durante 12 horas à temperatura de 4°C, seguida de lavagem em PBS 0,05M. Incubação com estreptoavidina-peroxidase (Sigma St Louis, USA) diluída em PBS 0,05M pH 7,4 durante 30 minutos, seguida de lavagem em PBS 0,05 pH 7,4 e revelação da peroxidase com diaminobenzidina (Sigma, St Louis, USA) a

0,1mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,2 e peróxido de hidrogênio (Merck, Brasil) 0,3%. Após a contra coloração com hematoxilina de Harris durante 3 minutos, seguida da lavagem em água corrente, os cortes foram desidratados em gradiente crescente de etanol, xilol e montagem permanente entre lamínula com resina Entelan. Como controles das reações de lectinas foram incubadas utilizando soluções de lectinas previamente preparadas com o respectivos açúcares inibidores na concentração de 0,1M.

Dentre as lectinas biotiniladas testadas, a ECL (*Erytrina cristagalli* lectin) apresentou marcação positiva constante nas células que perfaziam o revestimento externo do blastocisto e das células mais externas da placenta vitelina em contato com o tecido materno ao longo da gestação. Esta lectina foi utilizada como marcador desta população celular e a reação realizada nas lâminas da série 3 e 8 contendo os cortes seriados dos úteros contendo os sítios de implantação e de desenvolvimentos embrionários para avaliar a distribuição e localização desta população celular na interface materno-fetal ao longo da gestação.

Sigla	Procedência	Lectina	Açúcar inibidor
DBA	Sigma – L2650-	<i>Dolichos biflorus agglutinnin</i>	n-acetil galactosamina
SBA	Honen	<i>Soybean agglutinin</i>	n-acetil galactosamina
DSL	Vector –L2766-	<i>Datura stramonium</i>	n-acetil glucosamina
ECL-	Vector B-1145	<i>Erytrina cristagalli</i>	Galactose
GSL II-	Vector B-1125	<i>Grifonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>	n-acetil glucosamina
JL	Vector – L3515	<i>Artocarpus intergrifolia</i>	Galactose
LEL	Vector-B-1175	<i>Lycopersicon esculentum</i>	n-acetil glucosamina
STL-	Vector B 1165	<i>Solanum tuberosum lectin</i>	n-acetil glucosamina e acido n-acetilmuramico
VVL	Vector-1235	<i>Vicia villosa</i>	n-acetil galactosamino

Quadro 1 - Relação das lecinas biotiniladas, sigla e seu açúcar inibidor.

3.4 REAÇÕES IMUNOCITOQUÍMICAS PARA CITOQUERATINA

Para as reações imunocitoquímicas os seguintes anticorpos: anti-human Cytokeratin (clone AE1/AE3, DakoCytomation, Ref M3515); anti-human Cytokeratin (clone MNF116, Dako, Ref M0821); anti-human Cytokeratin HMW (clone 34 β E12, DakoCytomation, Ref. M0630); anti-human Cytokeratin 7 (clone OV-TL 12/30, DakoCytomation, Ref M7018); anti-human Cytokeratin 20 (DakoCytomation, Ref. M7019); Cytokeratin 8 LMW (clone 35 β H11 – monoclonal de camundongo anti-humana, Dako Corporation, Ref M0631). Como anticorpo secundário correspondentes foi utilizado o policlonal anti-camundongo feito em cabra peroxidase (Vector, Ref. AI9200).

Cortes histológicos desparafinizados do sítio de desenvolvimento embrionário de cobaio no 20º dg foram utilizados para os testes. Este consistiu no bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS 0,1M pH 7,4, seguida do bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 0,1% em PBS 0,1M pH 7,4 e incubação com o anticorpo primário em diluição recomendada pelo fabricante. Após incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Vector, Ref. AI9200), foram reveladas pela diaminobenzidina 0,1mg/mL/em tampão Tris HCl 0,05M pH 8,2 e peróxido de hidrogênio 0,3%, seguida da contra-coloração com hematoxilina e montagem permanente.

Pela avaliação da especificidade e sensibilidade dos anticorpos testados, o anticorpo anti cytokeratin 7 (CK7, clone OV-TL 12/30, Dako, Ref M7018) apresentou os melhores resultados e este foi adotado para realizar as reações imunocitoquímicas nas séries das lâminas 5 e 10 contendo os cortes seriados do útero gestante de cobaio em todos os dias de gestação.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram obtidas os seguintes resultados:

4.1 CICLO ESTRAL E ESTABELECIMENTO DA IDADE GESTACIONAL

O esfregaço vaginal do cobaio fêmea corado pelo método de Shorr permitiu definir os períodos do ciclo estral do animal a partir da identificação do padrão da celularidade (Figura 1), como segue:

- Diestro: diversidade de tipos celulares, com a predominância de células superficiais basófilas podendo perdurar de 3 a 10 dias do ciclo (Figura 1A);
- Proestro: predominância de células intermediárias acidófilas e menor quantidade células basófilas (Figura 1B) com duração de 3 a 4 dias do ciclo;
- Estro: presença de poucas células superficiais sendo estas essencialmente acidófilas (Figura 1C), além de grande quantidade muco. A duração deste estágio é curta entre 12 e 24 horas.
- Metaestro: presença de leucócitos em grande quantidade (Figura 1D), com predomínio de células intermediárias e células parabasais freqüentemente formando agregados que podem perdurar de 3-5 dias. No início desta fase eram identificados com maior freqüência os espermatozóides do que quando comparados com o estro. A confirmação do início do metaestro com (Figura 1E) ou sem (Figura 1F) a constatação do espermatozóide foi estabelecido como critério primário para diagnosticar o primeiro dia da gestação, seguido do padrão de citologia compatível de diestro mantendo-se ao longo dos dias subseqüentes confirmando a prenhez do animal.

Foram observadas variações nos estágios identificadas pela citologia vaginal, sendo este considerado no cobaio pouco constante. Assim o ciclo estral pode variar entre o mínimo de 9 e o máximo de 21 dias em fêmeas nulíparas. Interessante observar que em 3 animais que apresentaram o padrão de citologia vaginal duvidoso, verificou-se um segundo acasalamento (confirmado pela presença de espermatozóides)

coincidente com o padrão citológico de metaestro (em período curto) e posteriormente estacionando em diestro. Nestes 3 casos, a idade gestacional, avaliada pelo estágio de desenvolvimento do embrião em análises histológicas, era mais avançada do que a esperada. Nestes animais, o padrão da citologia vaginal foi revisado, sendo constatados períodos irregulares de ciclo com metaestro extremamente curto, que não havia sido constada nas análises rotineiras e com provável acasalamento no período diurno.

Estas constatações reforçam a dificuldade de flagrar o estágio onde efetivamente a fêmea é receptiva ao macho para a cópula que aparentemente pode acontecer em qualquer período do dia. Neste sentido, as coletas dos esfregaços vaginais realizadas em intervalos de 24 horas (período matutino sempre no mesmo horário do) para a detecção do espermatozóide mostraram-se pouco confiáveis, sendo imprescindível a análise contínua do padrão da citologia vaginal para assegurar com maior precisão a idade gestacional do cobaio.

4.2 O AMBIENTE UTERINO NÃO GESTANTE

O útero do cobaio é do tipo bicornuado e apresentou nos cortes histológicos a luz uterina com trajeto sinuoso que propagava-se obliquamente da região mesometrial para a anti-mesometrial. Através dos cortes seriados constatou-se ser uma luz helicoidal (Figura 2). Este trajeto helicoidal da luz é acompanhado pelos demais componentes teciduais do endométrio, miométrio e perimétrio, determinando uma inclinação oblíqua do eixo mesometrial/anti-mesometrial (Figura 2B), assim como, uma assimetria latero-lateral do endométrio em corte transversal (Figura 2C), isto é, a luz uterina não apresentava o seu trajeto principal na porção central ou mediana no útero do cobaio.

A luz uterina é revestida pelo epitélio colunar simples ciliado (Figura 2D) apoiada no estroma endometrial constituído de tecido conjuntivo frouxo não apresenta distinção entre a região mesometrial e anti-mesometrial. As glândulas tubulosas simples estão distribuídas tanto na porção mesometrial quanto anti-mesometrial (Figura 2B-G). O miométrio (figura 2G) constituído de três estratos (circular interna, longitudinal

externa e a intermediária vascular) de tecido muscular liso e mais externamente o perimétrio constituído de tecido conjuntivo frouxo revestido pelo mesotélio (Figura 2C,H). O perimétrio na região mesometrial continua com o próprio mesométrio por onde penetram os grandes vasos sanguíneos (vs) (Figura 2E,G).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NA INTERFACE MATERNO-FETAL

As reações citoquímicas de PAS, AT e de lectinas, juntamente com imunocitoquímica para citoqueratina foram adotadas para estabelecer possíveis marcadores seletivos para distinguir e localizar populações celulares da interface materno-fetal no útero gestante de cobaias.

4.3.1 Reação citoquímica de PAS

As reações de PAS com ou sem o tratamento prévio pela amilase nos cortes histológicos de sítios uterinos contendo embrião em desenvolvimento, revelaram diversas populações PAS positivas, tanto nos tecidos maternos quando no próprio embrião/feto em desenvolvimento (Figura 3A,B). Esta técnica não destacou qualquer população celular com padrão de marcação seletiva. Em decorrência deste padrão pouco seletivo, este método citoquímico não foi adotado para análises sistemáticas no conjunto de amostras.

4.3.2 Reação citoquímica de Azul de Toluidina (AT)

A reação de citoquímica com Azul de Toluidina em pH ácido foi realizada para identificar populações celulares com conteúdo de poliânions que resultam em reação metacromática. Porém não foram identificadas quaisquer células com estas

características em meio aos tecidos uterinos ou no embrião em desenvolvimento (Figura 3C-F). Então, não revelaram reatividade seletiva ou específica em quaisquer das populações celulares presentes no endométrio decidualizado ou não decidualizado.

4.3.3 Reação citoquímica de lectina

As análises prospectivas realizadas através das reações de citoquímica com um painel de lectinas (Quadro 1) em cortes histológicos do útero em diferentes períodos de gestação revelaram padrões de marcação distintos entre as lectinas. Dentre as lectinas adotadas (Figura 4 e 5), a ECL (*Erythrina cristagalli* lectin) que tem afinidade pelo açúcar galactose apresentou marcação seletiva para a população de células trofoblásticas que fazia o revestimento do blastocisto desde a fase da destituição da zona pelúcida e ao longo da gestação perfazendo a camada mais externa da membrana vitelina e âmnio-vitelina em contato com o tecido materno. (Figura 4A,B,C).

No tecido endometrial, a lectina *Grifonia simplicifolia* (GSL) identificou seletivamente uma população de células mononucleares de formato esférico e sem grânulos citoplasmáticos, presentes de forma isolada no estroma do endométrio mesometrial e que apresentavam reação positiva na superfície celular (Figura 4 D,E,F). As demais lectinas, apresentavam reações positivas em diversas populações celulares e mesmo em componentes da matriz extra-celular (Figura 4G-O, 5A-M), sendo pouco seletivas para serem adotadas como marcadores de populações celulares da interface materno-fetal do útero gestante de cobaias.

4.3.4 Reação imunocitoquímica para citoqueratinas

Os testes realizados com cinco anticorpos em reações imunocitoquímicas para a citoqueratina demonstraram padrões distintos de marcações nas diferentes

populações celulares presentes na interface materno-embrionária do útero do cobaio (Figura 6). Dentre os anticorpos testados, o anti-CK7 foi o que identificou com maior especificidade as populações de células trofoblásticas (Figura 6A), enquanto os demais anticorpos apresentaram marcação citoplasmática nas diversas populações de células trofoblásticas e também nas células decidualizadas do estroma uterino, dificultando a distinção entre o tecido materno e trofoblasto para estabelecer os limites da interface materno-fetal nos diferentes períodos da gestação. As análises subseqüentes foram realizadas exclusivamente nos materiais submetidos à reação imunocitoquímica com anticorpo anti-CK7 para a identificação das células trofoblásticas.

4.4 A DINÂMICA DA RESPOSTA ENDOMETRIAL E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO RELACIONADO COM A ORGANOGÊNESE DA PLACENTA VITELINA

A dinâmica das alterações do endométrio em resposta à presença do blastocisto e o seu desenvolvimento com particular enfoque na origem e destino das células que forma a placenta vitelina foram avaliadas a partir do 6º dg e a sua evolução diária acompanhada até o 15º dg. Devido à extensão e complexidade das variações contínuas tanto do endométrio, quanto do próprio embrião em desenvolvimento, estes serão descritos separadamente em cada dia de gestação e quando pertinente comentados em conjunto para a compreensão temporal das interações entre o endométrio e o embrião.

4.4.1 6º dg

O endométrio:

A partir do 6º dg foi possível constatar o início de uma resposta localizada do útero frente à presença do blastocisto. Nos cortes seriados do útero em plano longitudinal, constatou-se áreas onde a luz uterina estava colabada (Figura 7A) pela aposição

das superfícies apicais do epitélio uterino (Figura 7B-G) e em meio a este epitélio, a presença do blastocisto ainda com a sua zona pelúcida (Figura 7E-G). O epitélio do tipo colunar simples que envolvia tanto o blastocisto quanto a que se estendia para as áreas contíguas apresentavam-se íntegras (Figura 7B-G). Enquanto algumas camadas das células do estroma endometrial próximo ao epitélio que envolve o blastocisto apresentava-se decidualizada (Figura 7E-G), o restante do estroma endometrial era semelhante ao do útero não gestante, isto é, constituído de tecido conjuntivo frouxo.

O blastocisto:

O blastocisto com dimensão em torno de 45µm ainda com o revestimento externo pela zona pelúcida (ZP) encontrava-se livre na luz uterina não aderida ao epitélio (Figura 7E-G). Os cortes seriados revelaram a presença de duas massas celulares (TS e EM) em polos opostos (Figura 7 E,F) no interior do blastocisto separadas pela cavidade ampla de blastocelo (BC) que tinha as suas laterais delimitadas por uma delgada monocamada de trofotoderma (T). A reação com lectina ECL não apresentou reação positiva em nenhuma população celular (Figura 7G).

4.4.2 7º dg

O endométrio:

A área do útero contendo o sítio de implantação embrionária tornou-se facilmente distinguível pela ampliação da reação decidual do endométrio ao redor do blastocisto (Figura 8A). A implantação do blastocisto decorre da destituição do revestimento epitelial uterino e através do qual se insinua junto ao estroma endometrial. O epitélio uterino sofre uma rápida retração e degeneração resultando no blastocisto completamente envolvido pelo estroma decidualizado (Figura 8B). O epitélio uterino íntegro pode ser encontrado nas áreas próximas às extremidades do blastocisto que cresce rapidamente em comprimento no sentido mesometrial.

O blastocisto:

A dimensão do blastocisto em implantação no 7ºdg avaliado pelos cortes seriados demonstraram a perda da sua zona pelúcida e o rápido crescimento em comprimento (Figura 8B) e o aumento das massas celulares localizadas nos pólos opostos deste blastocisto em forma de cilindro. A orientação do crescimento do blastocisto eclodido de formato cilíndrico, nitidamente acompanhava o trajeto da luz uterina no sentido anti-mesometrial/mesometrial e, portanto tortuoso, de eixo helicoidal, dificultando a reconstituição nos cortes seriados.

A citoquímica com a lectina ECL revelou a marcação positiva seletiva para a monocamada de células trofoblásticas aqui denominadas de trofoblasto mural (TM) que revestem a cavidade de blastocelo (BC) e as células trofoblásticas mais externas que revestem tanto a massa de células do pólo mesometrial aqui denominadas de trofoblastos fonte (TS) quanto da anti-mesometrial, aqui denominadas de embrioblastos (EM) (Figuras 8C-E). A denominação de trofoblastos fonte (TS) para a massa celular localizada no polo mesometrial do blastocisto faz alusão ao seu desenvolvimento e formação do cone ectoplacentário que originará a placenta hemocório-alantoidiano nos estágios posteriores. Igualmente, a denominação de embrioblasto (EM) para a massa celular localizada no pólo anti-mesometrial do blastocisto faz alusão à origem dos folhetos embrionários a partir desta massa celular nos estágio subseqüentes do desenvolvimento embrionário.

4.4.3 8ºdg

O endométrio:

A ampliação da extensão da reação decidual do endométrio mesometrial e anti-mesometrial (Figura 9A), resultou no crescimento localizado do sítio uterino, formando estruturas nodulares distinguíveis macroscopicamente. Neste estágio não houve qualquer vestígio do epitélio uterino ao redor do blastocisto (Figura 9B-G). Entre este estroma decidualizado e o miométrio foram encontradas áreas do estroma endometrial não decidualizado constituída de tecido conjuntivo frouxo semelhante àquela observado no útero não gestante, onde também estavam

confinados os resquícios das glândulas tubulosas. O estroma endometrial das áreas vicinais à da implantação do blastocisto, isto é no segmento de inter-implantação embrionária era tipicamente de tecido conjuntivo frouxo com maior abundância de glândulas e embora o epitélio uterino ainda estivesse presente a luz uterina encontrava-se obliterada (Figura 9A). Na interface com o blastocisto, foram verificados a formação de espaços entre o limite do blastocisto e o tecido materno nas áreas que circundam o maciço celular (embrioblasto) localizado na região anti-mesometrial (Figura 9B,E) e ao longo do restante do blastocisto era comum a presença de restos celulares ou células com compactação da cromatina nuclear, evidenciando a ocorrência de degeneração das células do estroma endometrial (Figuras 9C,D).

O blastocisto:

O blastocisto localizado em meio ao endométrio decidualizado através do cortes seriados apresentava o formato mais acentuado de um cilindro longo e tortuoso (Figura 9B-D) atingindo dimensão aproximada de 400um quando reconstituídas nos cortes seriados.

Pela citquímica de lectina ECL (Figura 9E-G), a região da blastocèle do blastocisto estava revestida por monocamada de células trofoblásticas mural (TM) ECL positiva de formato pavimentosa, sendo a reação positiva predominantemente na superfície apical destas células (Figura 9F). Estas células trofoblásticas murais ECL positivas eram contínuas com as células que faziam o revestimento externo da massa celular embrioblásticas (EM), pelo que se presume serem estas células também trofoblásticas (Figura 9E). Igualmente, no pólo da massa celular de trofoblasto fonte (TS) aquelas mais externas apresentavam reação lectina ECL positivas (Figura 9G). Nesta idade gestacional, tanto a massa de EM quanto de TS eram constituídas de células globosas ECL negativas, organizadas em estruturas esferoidais maciças no interior do blastocisto (Figura 9E,G). Nas regiões de contato com o endométrio, não foram constatadas células trofoblásticas ECL positivas se destacando ou emitindo prolongamentos citoplasmáticos que conotasse atividade invasiva.

4.4.4 9° dg

O endométrio

A reação decidual continuada resultava na sua expansão ocupando a quase totalidade do endométrio da região anti-mesometrial ao mesometrial (Figura 10A-C), mantendo uma delgada camada de endométrio não decidualizado próximo ao endométrio e com raras estruturas epiteliais remanescentes das glândulas uterinas. A formação nodular facilitava a delimitação macroscópica do sítio do desenvolvimento embrionário no corno uterino, contudo os cortes seriados em plano transversal demonstraram a inclinação oblíqua e tortuosa do eixo de crescimento do blastocisto no interior do endométrio, decorrente provavelmente ainda da influência do trajeto da luz uterina. Em algumas das amostras, observaram-se áreas de extração e pouca preservação do tecido endometrial ao redor do blastocisto (Figura 10A-E), sugerindo deficiência na fixação ou processamento incompleto devido à dimensão do material. Contudo, o fato da preservação adequada do blastocisto nesta mesma área, sugere uma labilidade do tecido endometrial provavelmente decorrente da degeneração tecidual e infiltração de tecido sanguíneo difícil de se mantida nos cortes em parafina.

O blastocisto:

Pela análise das seqüências dos cortes seriados, a reconstituição do blastocisto lembrava uma estrutura de formato cilíndrico longo e tortuoso, com uma extensa área central oca separando as massas celulares embrioblásticas (Em) situada na região anti-mesometrial do endométrio e a massa de células trofoblásticas fonte (TS) o primórdio do cone ectoplacentário localizado no pólo oposto do blastocisto voltada para a região mesometrial do endométrio (Figura 10D-F).

Pela citoquímica de lectina ECL, a blastocela do blastocisto estava ainda revestido externamente pela monocamada de trofoblasto mural (TM) com formato pavimentosa, cuja superfície apical fortemente reativa à lectina ECL estava em íntimo contato com as células endometriais decidualizadas (Figura 9E). As células

trofoblásticas ECL positivas foram constadas ainda revestindo externamente tanto a massa de células EM quanto TS.

Neste estágio foi constatada a cavitação tanto no interior da massa celular EM (Figura 10D,G) quanto TS (Figura 10F,I), constituindo os primórdio da cavidade pró-amniótica (pCAm) e a cavidade ectoplacentária (CE), respectivamente. A cavidade ectoplacentária (CE) expande-se rapidamente formando uma projeção cuneiforme de células trofoblásticas a partir da base situada junto à blastocle expandindo para o sentido mesometrial dando início à organização do cone ectoplacentário (TP-CE) (Figura 10 F,I). Entrepondo-se entre este cone ectoplacentário (TP-CE) em formação e o embrioblasto (Em) era mantida uma grande cavidade cilíndrica de blastocle (BC) revestida ainda pela monocamada de trofoblasto mural (TM) (Figura 10E,H) em íntimo contato com o estroma decidualizado. A cavitação no interior da massa celular de EM inicia a formação dos folhetos embrionários, delimitando um conjunto de células voltada para a blastocle que dará origem ao amnioblasto e outro conjunto primórdio do epiblasto acolado ainda às células trofoblásticas murais ECL positivas (Figura 10D,G,J). A partir desta fase, o blastocisto transforma-se em embrião, com o início da formação dos folhetos embrionários,

4.4.5 10º dg

O endométrio:

O endométrio decidualizado ocupava a maior extensão do sítio uterino onde se desenvolvia o embrião (Figura 11 A-D) e este em crescimento se estendia da região anti-mesometrial ao mesometrial em trajeto menos tortuoso, porém ainda com inclinação oblíqua conforme constatado em cortes seriados. As células endometriais na região anti-mesometrial em interface com o embrião e na maior extensão ao longo do perímetro da blastocle, apresentavam-se íntegras (Figura 11E-K) e em íntima associação com as células trofoblásticas.

O embrião:

No 10^ºdg, o embrião como um todo formava uma estrutura cilíndrica que ocupava a área central do endométrio decidualizado tendo o seu pólo embrionário localizado na porção anti-mesometrial e o pólo oposto onde se organizava o cone ectoplacentário, notadamente em forma de cunha avançava em direção da região mesometrial (Figura 11A-D,H,K). O perímetro externo deste embrião estava revestido por uma camada de células trofoblásticas ECL positivas tanto no pólo embrionário (Figura 11F,G) quanto na região da blastocele (Figura 11I,J) e mesmo o conjunto de trofoblastos do cone ectoplacentário em formação era externamente revestido por uma monocamada de trofoblasto pavimentoso ECL positivo (Figura 11L,M).

A massa celular embrioblástica (Em) antes uma estrutura esferoidal com a formação de uma cavitação no seu interior (Figura E), apresentava-se nos cortes seriados agora como uma estrutura mais alongada e elíptica com uma cavitação interna assimétrica, isto é, havia uma extremidade mais dilatada e outra menos dilatada. A cavidade em formação é o primórdio da cavidade amniótica (PCAm) que estava revestida de um lado por camada de células amnioblásticas em contato com a blastocele (Figura 11E,G) e um conjunto de várias camadas de células embrioblásticas maiores, de formato poliédrico, com núcleo esférico e cromatina pouco condensada formavam a parede lateral e o assoalho côncavo desta cavidade, constituindo o epiblasto em contato com o PCAm e o hipoblasto em contato com monocamada de células trofoblásticas murais (TM) ECL positivas (Figura 11E,F,G). Nos cortes seriados que evidenciaram a cavitação assimétrica também demonstraram quantidades variadas de células embrioblásticas constituindo o epiblasto e o hipoblasto. Esta assimetria resultava da organização do eixo caudal-cefálico do embrião, onde a porção cefálica estava localizada mais distalmente em relação ao pólo do cone ectoplacentário, enquanto a porção caudal crescia acolada ao trofotoderma mural, paralela à blastocele e em direção ao pólo do cone ectoplacentário.

A cavidade da blastocele presente entre o limite do amnioblasto e o cone ectoplacentário no pólo oposto continuava como uma longa estrutura cilíndrica, cuja parede lateral estava ainda revestida por uma única camada de células trofoblásticas murais ECL positiva (Figura 11H-J).

Acima da blastocele, o cone ectoplacentário apresentou um grande crescimento em comprimento assumindo o formato de um verdadeiro cone longo e pontiagudo (Figura 11H,K) com uma extensa cavitação interna. A projeção pontiaguda era decorrente do crescimento do folheto laminar de células trofoblásticas já presente no estágio anterior, onde projetava-se a partir do assoalho do cone (Figura 11K-M), atravessando a porção mediana e central da cavitação do cone ectoplacentário para atingindo e projetando o ápice do cone. Pela citoquímica de lectina ECL, uma camada contínua de células trofoblásticas revestia toda a extensão do perímetro externo do cone ectoplacentário (Figura 11J,L,M). A reação da lectina era positiva na superfície livre destas células trofoblásticas que à semelhança daquelas células TM envolvendo a blastocele apresentavam o formato poliédrico (Figura 11I,J,M). Abaixo destas células trofoblásticas ECL positivas foram encontradas outras camadas de células trofoblásticas em contato com a cavidade do cone ectoplacentário (CE), porém ECL negativas (Figura 11J,L,M). Igualmente, as células trofoblásticas do assoalho do cone, assim como aquelas do folheto que se projetava para o ápice do cone eram ECL negativas (Figuras 11J,L,M).

Cumprе salientar na organização do cone ectoplacentário, a presença de pelos menos 3 subpopulações de células trofoblásticas nesta fase. A primeira, identificada como ECL positivas oriundas do revestimento trofodermico desde o blastocisto recém-eclodido no 7º dg e que mantém como o revestimento mais externo, contínuo com as células TM e abaixo desta, aquela que se manteve acoplada à borda externa do cone ectoplacentário enquanto ocorria a cavitação da massa celular de trofoblasto fonte (TS). A terceira população origina-se da propagação e crescimento das células trofoblásticas localizadas inicialmente no assoalho do cone e que propagou e projeto para o interior do cone, atingindo o ápice do deste cone ectoplacentário em formação. Não foram constatadas nesta fase, a presença de células trofoblásticas com características invasiva, isto é formação de celas trofoblásticas gigantes, sinciciais ou isoladas desprendendo-se da parede do embrião.

Igualmente, é importante salientar o ponto de intersecção formado exclusivamente por células trofoblásticas na base do cone ectoplacentário em contato com o TM que reveste a cavidade da blastocele (Figura 11J), uma vez que, neste ponto estão presentes as três subpopulações de trofoblasto e este será também, o local de onde

nos estágios subseqüentes originarão os primeiros pequenos trofoblastos que se desprendem da parede do cone e infiltram-se no interior do endométrio.

4.4.6 11º dg

O endométrio:

No 11º dg amplas áreas de extração tecidual ao redor do blastocisto refletem a degeneração do endométrio (Figura 12A,B) com extravasamento sanguíneo, principalmente na região mesometrial junto ao cone ectoplacentário em desenvolvimento (Figura 12 C-G). Nesta região foram constadas as primeiras células trofoblásticas invasivas oriundas do cone ectoplacentário (Figura 12C-G), algumas das quais localizadas profundamente em meio ao tecido endometrial.

O embrião

O embrião como um todo apresentou ainda o formato de um cilindro longo com o eixo maior orientado no sentido anti-mesometrial/mesometrial e ocupando a porção mediana do endométrio (Figura 12A,B). O cone ectoplacentário localizado no endométrio mesometrial constituía a massa celular maior formada por trofoblastos com morfologias variadas (Figura 12C-G). Além das células trofoblásticas pequenas confinadas no interior do cone ectoplacentário e das células trofoblásticas ECL positivas perfazendo a maior parte do perímetro externo do cone ectoplacentário (Figura 12E-G), foram constadas nesta fase a diferenciação de células trofoblásticas gigantes que emitiam prolongamentos citoplasmáticos amplos e nítidamente invadiam o endométrio confinando sangue materno extravasado juntamente com células do estroma endometrial em degeneração (Figura 12C,D) e também células trofoblásticas sinciais tanto no interior do cone quanto externamente ao perímetro formado pelo trofoblato ECL positiva (Figura 12G). O cone ectoplacentário que até a fase anterior era integralmente delimitada por uma camada de células trofoblásticas murais ECL positiva, estas agora apresentam áreas de descontinuidade de onde as células trofoblásticas gigantes e sinciais penetravam para o interior do endométrio (Figura 12C,D,F).

Abaixo do cone ectoplacentário, a blastocele era uma ainda uma ampla cavidade cilíndrica delimitada no outro extremo pelo amnioblasto (Figura 13A) e lateralmente na sua maior extensão por uma monocamada de células trofoblásticas murais ECL positivas (Figura 13F-L). Pelas análises dos cortes seriados, a massa celular do polo embrionária agora estava definida como uma estrutura de forma cilíndria com uma porção mais dilatada (cefálica) e outra mais afilada (caudal) confinando no seu interior a cavidade pró-amniótica (Figura 13A-D). A celularidade das paredes desta cavidade pró-amniótica apresentavam variações morfológicas significativas, onde o amnioblasto apresentava-se como uma monocamada de células pavimentosas revestindo a face superior da cavidade pró-amniótica (Figura 13H,C), na porção mais cefálica formavam um conjunto de células em multicamadas que continuavam com as células do epiblasto formando na extremidade uma massa celular compacta (Figura 13A). Na porção caudal, a cavidade tornava-se cada vez menor e as células do amnioblasto eram formadas por células poliédricas em multicamada e continuavam também com as do epiblasto (Figura 13D). O folheto epiblastico estava constituído de múltiplas camadas celulares, sendo a grande maioria de formato poliédrico baixo ou colunar (Figura 13E,J) e algumas daquelas aquelas localizadas na borda do folheto e acoladas ao trofoblasto mural ECL positivas, tornavam-se achatadas ou alongadas (Figura 12H-L) constituindo os primórdios do hipoblasto. Da proliferação e diferenciação desta nova população celular formam-se o folheto endodérmico e aquelas localizadas nas bordas dos folhetos duplos epi- e hipoblasto próximas à cavidade da blastocele migram acoplada à superfície do trofoblasto mural ECL positiva voltada para a blastocele, dando início à formação do revestimento da blastocele pelo endoderma extra-embrionário parietal (Figura 13H,I). Este processo aparentemente propagava ao longo da parede da blastocele (Figura 12G) em direção da região do cone ectoplacentário, uma vez, que áreas ainda destituída deste revestimento endérmico foi observada nas regiões mais próximas ao cone (Figura 12F). O endoderma extra-embrionário iniciava também a propagação sobre o amnioblasto, isolando este da blastocele.

Com a formação dos dois folhetos a partir da massa celular embrioblástica no pólo embrionário, consolidou a organização dos folhetos ectodérmicos e endodérmicos primitivos. O endoderma extra-embrionário derivado destes folhetos e que migram

revestindo a blastocele organiza o início da formação da placenta vitelina e a transformação da blastocele em cavidade vitelina.

4.4.7 12° e 13° dg

O endométrio:

O endométrio da região anti-mesometrial que envolvia a maior extensão e em contato com o embrião apresentava-se desestruturado, com células degeneradas, apresentando espaços acelulares ocasionalmente com sangue extravasado (Figuras 14A-D e 15A,D,E). O fato de não ocorrer uma interação física entre as células trofoblásticas murais e o tecido endometrial, a ocorrência deste espaço, sugere que o embrião nesta área não está efetivamente ancorado na parede uterina (Figura 14A,C,D), exceto pela região mesometrial onde o cone ectoplacentário expande com as suas populações trofoblásticas invasivas penetrando profundamente no endométrio decidualizado (Fig 15A,B). endométrio ao redor do cone ectoplacentário também apresentava extensa área de tecido em degeneração com extravasamento sanguíneo, porém, nesta área verificavam-se íntima associação das células trofoblásticas com o tecido endometrial, inclusive extensões de trofoblastos invadindo profundamente o endométrio e revestindo o leito dos vasos sanguíneos (Figura 15D-E).

Estes dados sugerem que o embrião até esta fase de 12-13^{dg} (Figuras 14 e 15) tem a sua maior extensão livre do contato com o tecido endometrial, exceto na mesometrial onde se insere o cone ectoplacentário, o qual efetivamente ancora o corpo do embrião à parede uterina.

O embrião e a placenta vitelina:

O ectoderma oriundo do epiblasto inicia a formação de um sulco longitudinal na superfície voltada para a cavidade amniótica, correspondente ao primórdio da crista neural (Figura 14B) que percorria ao longo da porção mediana para a cefálica do ectoderma (Figura 15B,C). Abaixo do ectoderma, foram identificadas várias camadas

de células, onde o endoderma localizava-se justaposto ao trofoblasto mural – lectina ECL positiva e entre o ectoderma e endoderma, formavam-se células menores e menos coesas correspondente ao mesoderma embrionário (Figura 14E). A camada do mesoderma embrionário em formação era mais evidentes nas áreas onde o disco embrionário estava em contato com o trofoblasto mural e na borda da extremidade deste disco onde também, a camada do ectoderma era menos espessa (Figura 14EF). Nesta região da extremidade do disco embrionário em formação onde ocorria a junção ectoderma-amnioblasto (Figura 14EF) era verificada agora o revestimento contínuo de uma delgada monocamada de células pavimentosas sobre a superfície do amnioblasto voltada para blastocele correspondente ao endoderma extra-embrionário que irá constituir mais tarde o endoderma visceral. Este revestimento endodérmico originava-se das células mesmas células que formavam o revestimento de endoderma extra-embrionário da parede da blastocele (Figura 15D). Esta migração das células endodérmicas extra-embrionário revestindo a cavidade da blastocele prossegue em direção ao cone ectoplacentário no 12º dg e concluída no 13º dg, uma vez que, este endoderma extra-embrionário era encontrado revestindo as células trofoblásticas que formaram o assoalho da cavidade formada pela projeção laminar no interior do cone ectoplacentário que ocorreu no 9ºdg.

Nos cortes seriados foram constatadas as diferenças morfológicas regionais na organização do disco embrionário, refletindo a consolidação do eixo ântero-posterior (ou cefalo-caudal) do futuro embrião, com a organização dos folhetos ectodérmico a partir do epiblasto em contato com a cavidade amniótica, o endodérmico abaixo e ao longo do folheto ectodérmico e em contato com o trofoblasto e, o mesoderma que surge entre os folhetos ectodérmicos e endodérmicos inicialmente a partir da porção caudal e lateral deste disco embrionário.

No pólo oposto do embrião, o cone ectoplacentário continuava o seu crescimento com a ampliação da cavidade (Figura 14A) presente no interior do eixo laminar de trofoblasto que gradualmente assumia a forma de uma campânula, cuja abertura, era contínua com a cavidade da blastocele (Figura 15A). No 12º dg, esta abertura não estava ainda revestida internamente pelo endoderma extra-embrionário que gradualmente expandia do pólo embrionário para o pólo placentário e no 13º dg, este revestimento interno da blastocele que era completo (Figura 15A,D,F-G).

O revestimento de trofoblasto mural ECL positivas que apresentava apenas pequenas discontinuidades ao longo do perímetro externo do cone ectoplacentário, a partir do 12º dg eram evidentes as extensas áreas de discontinuidade por onde células trofoblásticas gigantes e sinciciais projetavam-se para o interior do endométrio mesometrial (Figura 15A-D) principalmente da região do ápice do cone. Nas áreas laterais, ao lado destes segmentos de discontinuidade, verificaram-se grupos de células trofoblásticas ECL positivas em multicamadas onde as mais externas desprendiam-se desta massa e infiltravam-se como pequenas células trofoblásticas ECL positivas junto ao tecido endometrial adjacente (Figura 15C-E). A incidência destas células trofoblásticas ECL positivas que desprendiam da parede do cone ectoplacentário acentuava-se no 13º dg, assim como de células trofoblásticas gigantes que se desprendiam do cone ectoplacentário e eram encontradas localizadas profundamente no interior do endométrio mesometrial. Na área correspondente à base do cone ectoplacentário era ainda encontrado o revestimento externo contínuo de células trofoblásticas mural ECL positiva, que por sua vez era contínua àquelas que revestiam a parede da blastocele, as quais em associação com as células do endoderma extra-embriônico completavam a organização da placenta vitelina (Figura 15F-H). Com o revestimento completo da blastocele pelo endoderma extra-embriônico, esta cavidade constitui agora o saco vitelino.

No segmento da junção placenta vitelina e cone ectoplacentária era observada ainda o resquício da cavidade ectoplacentária que margeava quase que inteiramente o perímetro interno da base do cone ectoplacentário. (Figura 15F) Interessante observar que a maior parte do embrião que se estende do pólo embriônico e ao longo parede da cavidade vitelina não está aparentemente em contato direto com o endométrio decidualizado. As células trofoblásticas murais ECL positivas que revestem a parede da cavidade vitelina apresentam formato poligonal com a superfície livre repleta de projeções tipo microvilosidades e o citoplasma vacuolizado (Fig 16H). Estas características morfológicas também observadas nos estágio anteriores denotam uma atividade absorviva em potencial destas células. Em se considerando que somente nesta fase as células trofoblásticas do cone ectoplacentário atingem diretamente o leito vascular materno, porém não há ainda a circulação placentária para a nutrição do embrião em desenvolvimento, é plausível

supor que as células trofoblásticas murais presentes revestindo amplamente o embrião até este momento tenham a importante função de absorver e transportar nutrientes para o embrião em crescimento.

4.4.8 Após o 15º dg

Uma vez constatada a consolidação da placenta vitelina no 13º dg, as análises nos períodos posteriores que se estenderam até o 56º dg visaram exclusivamente acompanhar o destino da placenta vitelina, em particular a permanência das células trofoblásticas ECL positivas constituindo esta membrana fetal.

A partir do 13º dg, foi constatado o início da formação do mesoderma extra embrionário ao longo da parede do saco vitelino (Figura 17A), ou melhor da placenta vitelina em se excluindo a porção em contato com a cavidade amniótica. A partir deste mesoderma extra-embrionário formam-se as pequenas ilhotas sanguíneas com o início da hematopoiese e angiogênese já evidente a partir do 15º dg (Figura 17B) num processo contínuo que transforma o mesoderma em tecido mesenquimal e culmina com a organização de uma rede vascular repleta de sangue fetal nesta parede do saco vitelino (Figura 16C-F). Ao longo deste processo, a monocamada de células trofoblásticas ECL positiva estava presente de forma contínua, sem qualquer vestígio de descontinuidade (Figura 16A-F).

Cumprе salientar que o revestimento de células trofoblásticas ECL positiva na região do cone ectoplacentário, gradualmente desaparece na medida em que se forma a placenta labiríntica do tipo âmnion-cório-alantoidiano, com a diferenciação dos diferentes tipos de células trofoblásticas que organizam esta placenta. O embrião em desenvolvimento no seu movimento morfogenético de fechamento latero-lateral e antero-posterior era gradualmente envolvido pelo amnion enquanto era formado o alantóide para a formação do primórdio do cordão umbilical e consolidação da conexão do corpo do embrião junto à base da placenta cório-alantoide. A formação da subplacenta, uma estrutura típica dos animais histicomorfo, ocorria em meio às células trofoblásticas da placenta em formação na área do cone ectoplacentário e iniciava por volta do 20ºdg.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O Ciclo estral do cobaio

A avaliação do esfregaço vaginal preparado pelo método de Shorr (Shorr 1940 a e b, 1941, Papanicolau 1942, Ford e Young 1951) é amplamente adotado para análise do ciclo estral dos animais retratando o regime hormonal e a sua influência nos órgãos reprodutores femininos. As nossas observações confirmam a ocorrência deste ciclo no cobaio nulípara com durações que variaram de 9 a 21 dias, divididas em 4 fases de acordo com o padrão da celularidade encontrada, à semelhança do relatos de Young ET al (1933). O acompanhamento do ciclo estral é ainda o método recomendado para avaliar o comportamento reprodutivo, uma vez que a fêmea não apresenta outras evidências na genitália externa.que permita avaliar o seu período fértil ou de acasalamento. Em nenhum dos nossos animais foi identificado a ocorrência do tampão vaginal descrito por Stockard e Papanicolau (1919) que pode estar presente ate 24 horas depois da cópula.

As definições das 4 fases do ciclo estral pela análise diária da citologia vaginal obedeceu o padrão da celularidade descrito na literatura (STOCKARD; PAPANICOLAU, 1919; SELLE, 1922; DURRANI et al., 1985; LILLEY et al., 1997; MUSARD, et al 2001 E TOUMA et al 2001). De acordo com estes autores, a fase receptiva da cobaia ao acasalamento ocorre no estro, embora a identificação/diagnostico do espermatozóide com maior freqüência era no metaestro, tornando confuso o estabelecimento preciso do início da gestação, Em nosso experimento, o primeiro dia de gestação foi estabelecido como sendo no dia da constatação do início da fase do metaestro, com ou sem a presença do espermatozóide, uma vez que o inicio da gestação era acompanhada de um metaestro prolongado, conforme foi detectado nas nossas avaliações diárias do esfregaço vaginal que se estendeu durante todo o período de gestação de cada um destes animais.

A adoção do cuidado em avaliar continuamente a citologia vaginal mesmo ao longo do suposto período gestante, permitiu flagrar 3 animais com padrão reprodutivo diferente. Nestes animais foram constatadas a presença de espermatozóide após

um período prolongado de metaestro (12-15dias), porém quando sacrificados para avaliar o período gestacional baseado nesta última identificação do espermatozóide, o estágio do desenvolvimento do embrião não era compatível com este período, mas sim somados ao do primeiro período prolongado do metaestro. Constatou-se portanto que as fêmeas destes animais podem praticar um segundo acasalamento durante a sua prenhez, Estas constatações reforçam a dificuldade de flagrar o estágio onde efetivamente a fêmea é receptiva para a cópula que aparentemente pode acontecer em qualquer período do dia, uma vez que o comportamento reprodutivo destes animais exige a manutenção contínua dos machos junto nas gaiolas para constituírem famílias. De acordo com Kaufumman (1977), estimar o exato momento da concepção em fêmeas nulíparas é difícil, por este motivo o uso de cobaias de segunda gestação é mais comum, as quais após, 24 horas do parto ocorre o estro com duração de 3 horas e meia (JANIAK, 1977), quando certamente pode ocorrer o acasalamento.

Organização do útero e sua resposta à gestação.

Como na maioria dos roedores, o útero do cobaio é do tipo bicornuado (Mossman, 19) e histologicamente os tecidos deste órgão estavam organizadas nas três túnicas que constituem o endométrio, miométrio e perimétrio, comuns à maioria dos mamíferos. Os cortes seriados efetuados no plano longitudinal e transversal do útero não gestante e nos períodos que antecedem a implantação embrionária, revelaram o trajeto helicoidal-elíptico com o eixo maior do passo orientado no sentido anti-mesometrial/mesometrial e com isto, a luz uterina observada em cortes transversais do útero apresentava-se excêntrica. Este padrão é diferente daqueles descritos para roedores como ratos e camundongos que tem um trajeto principal da luz uterina localizada na porção mesometrial e a projeção de criptas desta luz em direção à região anti-mesometrial (ENDERS; SCHLAFKE, 1967; ENDERS, 1969; BEVILACQUA OU ABRAHAMSOHN, 1996; MOSSMAN, 1977)

A constatação histológica do início da gestação no útero é possível somente após o 6ºdg quando o blastocisto está localizado na luz uterina e este colaba ao redor do

blastocisto com aposição das superfícies apicais do epitélio uterino. Nas fases anteriores a este período, a luz uterina é ampla, sem outros aspectos histológicos que permitam a identificação do possível sítio de implantação embrionária. A obliteração da luz uterina com aposição do epitélio uterino ao redor do blastocisto sinalizando o início da implantação uterina é observada também na cripta uterina de ratos e camundongos (ENDERS, 1969; MOSSMAN; WEISFELDT, 1939), sendo portanto um mecanismo comum que supostamente confina o blastocisto em um compartimento definido da luz uterina para a continuidade do processo de implantação embrionária. No cobaio, o confinamento deste blastocisto parece ocorrer também na metade anti-mesometrial do endométrio, porém, não necessariamente na porção mais distal desta como relatado anteriormente por Blandau (1949a),

Concomitantemente ao confinamento do blastocisto na luz uterina as células do estroma endometrial próximas a este compartimento iniciam a reação decidual, à semelhança do descrito em camundongos (Bevilacqua, 1978; Mossman, 1979), isto é, a reação decidual é desencadeada somente após a presença física do blastocisto na luz uterina. Interessante observar que o blastocisto do 6º dg ainda com o revestimento de zona pelúcida, rapidamente transpõe a barreira epitelial atingindo o estroma endometrial. De acordo com Enders (1989), é comum encontrar blastocisto com zona pelúcida junto ao estroma endometrial com epitélio uterino ainda aparentemente íntegro. Neste mecanismo, as pequenas projeções citoplasmáticas das células trofodérmicas atravessando a zona pelúcida parece ter uma função preponderante (ENDERS, 1989), onde de acordo com Blandau (1949), o blastocisto poderia produzir hormônios que sinalizam o tecido uterino. Diversos experimentos tem confirmado a sinalização entre o blastocisto e o tecido endometrial em ratos e camundongos, porém necessitam ser ainda confirmados no cobaio.

Uma vez inserida no estroma endometrial, este blastocisto rompe a zona pelúcida e inicia um rápido crescimento em comprimento, porém as células trofoblásticas murais que revestem o blastocisto, não se diferenciam em células trofoblásticas gigantes como em ratos (citação Enders) e camundongos (citação Bevilacqua). O estroma endometrial ao redor deste blastocisto implantado reage rapidamente com a propagação centrípeta da reação decidual que diferentemente de camundongos e

ratos que se alastra inicialmente na região antimesometrial apresenta uma simetria de propagação, atingindo também o endométrio mesometrial.

A orientação de crescimento deste blastocisto pos-implantacional no útero ocorre no sentido antimesometrial-mesometrial acomodando o blastocisto em forma de um cilindro que rapidamente cresce em comprimento. A acomodação do blastocisto em crescimento no endométrio do camundongo é um fenômeno intrigante. Diferente do que ocorre em ratos e camundongos onde o trofoblasto mural e abembrionário do blastocisto diferenciam-se rapidamente em células trofoblásticas gigantes altamente invasivas, destituindo e degenerando as células endometriais ao seu redor (BEVILACQUE, 1978, ENDERS, 1989), ou do blastocisto de humanos que formam o sinciciotrofoblasto responsável pela invasão e penetração no interior do endométrio decidualizado (ABRAHANSON, 1979), as células trofoblásticas não apresentam este tipo de comportamento nesta fase da implantação embrionária. Neste sentido, é intrigante observar a rápida e vasta degeneração do estroma endometrial ao redor do blastocisto em crescimento no útero de cobaio. Estas observações sugerem fortemente uma ação secundária do trofoblasto do cobaio neste mecanismo, sendo provavelmente ditado pelo ciclo das células endometriais acometidas na diferenciação e células deciduais. Esta forma de resposta endometrial merece investigações futuras detalhadas, uma vez que o sucesso da implantação e a acomodação do blastocisto aparenta ser decorre do controle mandatório do próprio útero e não do blastocisto. Uma das evidências que apóiam esta hipótese é a degeneração acentuada do endométrio ao redor do blastocisto e a maior extensão desta estar livre, sem apoio mecânico ou estrutural perceptível na parede do endométrio. exceto na área onde o cone ectoplacentário consolida a sua ancoragem na região mesometrial por volta do 12ºdg. A outra evidência está relacionada com o trajeto helicoidal da luz uterina. O crescimento do blastocisto até o 12ºdg acompanha o trajeto original desta luz e como consequência o longo blastocisto cilíndrico e o embrião inicial ainda em formato cilíndrico longo também apresenta o mesmo trajeto tortuoso. Portanto o leito da luz uterina determina o crescimento longitudinal do blastocisto e este direcionado para a região mesometrial do endométrio.

O blastocisto de duas massas celulares internas e sua implicação na origem da placenta vitelina.

O corte seriado do útero gestante no 6º dg revelou a presença de blastocisto ainda revestido pela sua zona pelúcida (pré-eclosão), porém já com uma cavidade blastocele revestida por monocamda de trofectodrma e que separavam duas massas celulares internas localizadas em pólos opostos. Esta organização do blastocisto pré-eclodido é diferente daquelas classicamente descritas em humanos e em ratos e camundongos , que apresentam uma única massa celular interna e a blastocele revestida pela monocamada de células trofectodermicas pavimentosas. Este blastocisto com duas massas celulares internas do cobaio foi descrito há mais de 60 anos por Blandau (1949a) e , sem que contudo, merecesse estudos que decifrassem as causas e consequências desta variação na constituição inicial do blastocisto na embriogênese.

Os nossos resultados baseados na reconstituição morfológica temporal e espacial do desenvolvimento embrionário inicial do cobaio são inéditos na demonstração de um intrigante e surpreendente processo na organização da placenta e do embrião do cobaio, distinto de humanos e outros roedores como ratos e camundongos que desenvolvem implantação intersticial e placentação hemocorial.

A primeira grande contribuição deste experimento é a demonstração inequívoca de que as duas massas celulares internas no blastocisto localizadas em pólos opostos são distintas entre si e já determinadas para destinos distintos na embriogênese. Uma das massas celulares diferenciam-se em embrioblastos que formam os futuros folhetos embrionários e estas estão estrategicamente localizados no pólo anti-mesometrial, enquanto a outra massa celular interna no pólo oposto voltado para a região mesometrial, aqui denominadas de células tronco trofoblásticas, diferenciam-se em populações de trofoblastos que organizam posteriormente o cone ectoplacentário.

O segundo ponto relaciona-se à origem e constituição da placenta vitelina invertida descrita em embrião de cobaio e em outros roedores (MOSSMAN, 1977; KAUFMAN, 1945). A formação da placenta vitelina invertida presume a destituição precoce do

trofoblasto mural durante a embriogênese no fenômeno denominado de metamorfose regressiva (GROSSER, 1909, 1927; AMOROSO, 1952, ENDERS, 1977), como consequência a parede do blastocisto seria revestido pelo endoderma extra-embrionário e este exposto, constituiria a interface com o tecido materno.

Não há relatos que questionem a viabilidade da placenta ter células de origem endodérmica no lugar do trofoblasto em contato com o tecido materno em animais de placentação hemocorial. Contudo, em camundongos (Yokoyama and Kin 2006) e em humanos (King ET AL, 2000) a não expressão de moléculas de MHC I ou II na superfície do trofoblasto é um dos quesitos imprescindíveis para o reconhecimento das células imunomoduladoras, em particular das células uNK na resposta imune inata para o pleno sucesso da gestação (Yokoyama e Kin, 2006). Não se sabe qual molécula MHC as células endodérmicas extra-embrionária expressam na sua superfície em contato com o tecido materno. O fato destas células não terem origem na trofotoderma ou mesmo da massa celular que dá origem aos trofoblastos do cone ectoplacentário torna pouco provável a possibilidade destas células expressarem moléculas da família MHC classe II não clássica, que são comuns às células trofoblásticas. Ao contrário, estas células, de acordo com Enders (1977), tem a mesma origem dos folhetos embrionários o que presume a expressão de moléculas MHC clássicas das células somáticas em geral do animal.

Tais características da organização estrutural da parede do blastocisto sugerem um mecanismo imunológico próprio nestes animais. A falta de marcadores celulares específicos é um fator dificultador para a plena elucidação desta questão. Porém os nossos resultados das análises citoquímicas prospectivas com a reação de PAS ou AT, não revelaram qualquer presença expressiva de leucócitos com grânulos PAS positivos, como as células uNK ou outros leucócitos granulares presente no útero de camundongos (Croy ET AL 2009), ou mesmo leucócitos com grânulos metacromáticos como mastócitos. Igualmente, o estudo prospectivo realizado pela citoquímica de lectinas não revelaram o acúmulo de células com morfologia compatível com leucócitos nos períodos iniciais da gestação analisado. Esta é uma evidência indireta de que o ambiente uterino gestante do cobaio não induz a ativação de resposta imune-inflamatória, sugerindo pouca ou ausência de estímulos que desencadeia uma resposta imunológica. Futuros estudos utilizando marcadores específicos para subpopulações de linfócitos, poderão esclarecer a participação da

resposta imune adaptativa no reconhecimento da gestação no útero de cobaias, porém, pelas evidências dos nossos resultados é pouco provável a ativação e envolvimento local de células da resposta imune inata.

A revisão da literatura relacionada com o desenvolvimento embrionário e da placenta em cobaio, exclui o envolvimento das duas massas celulares como potenciais distintos no desenvolvimento embrionário e fazem analogia com o desenvolvimento embrionário de outros roedores, particularmente o de camundongos como referência. De fato o blastocisto de camundongo apresenta uma única massa celular interna e a cavidade da blastocèle é rapidamente revestida por células endodérmicas extra-embrionário formando como um dos primeiros eventos morfogênicos pós-eclosão do blastocisto, o saco vitelino pela adição do endoderma ao trofoblasto mural ab-embrionário que reveste a cavidade da blastocèle (Perry, 1981; Müntener e Hsu, 1977). Não se pretende aqui revisar todo o processo da embriogênese de camundongos, porém como fonte de consulta e localização dos foi constituído um anexo (I) com desenho ilustrativo das principais fases na formação da placenta vitelina. Igualmente, uma sequência de esquemas ilustrativos da embriogênese do cobaio baseado em nossas observações constam do Anexo II.

Indubitavelmente, a dificuldade em padronizar a reprodução e a idade gestacional em grande escala para os cobaios, aliada à falta de marcadores celulares específicos para esta espécie animal tem contribuído para as importantes lacunas de conhecimento acerca da biologia da reprodução destes animais. Neste sentido, é importante ressaltar que o estudo prospectivo realizado com o painel de lectinas revelou a ECL (*Erythrina cristagalli lectin*) como um marcador altamente seletivo para as células trofoblásticas murais (TM) do embrião de cobaio, sem apresentar reação cruzada com outras populações trofoblásticas, ou, do embrião propriamente dito. Esta lectina reagia especificamente na superfície apical das TM e quando comparada com a expressão de citoqueratina em reação imunocitoquímica, mostrou-se superior em especificidade, uma vez que o padrão de reação de várias das citoqueratinas não distinguiram os tipos de trofoblasto ou mesmo apresentavam reação cruzada com outras células do estroma endometrial. Cabe salientar que a anti-citoqueratina 7 (CK7) apresentou reação preferencial (não específica) para as células trofoblásticas mural, reagindo na porção basal destas células, porém de

intensidade muito fraca. Esta marcação com a citoqueratina foi comparada com a da ECL em cortes seriados e o fato da reatividade coincidir para as mesmas células, confirmam que a ECL efetivamente reage com uma população de célula trofoblásticas..

Pelos resultados obtidos com a citoquímica de ECL, confirma-se que as células que revestem a cavidade blastocele são as células trofoblásticas murais nos blastocistos recém eclodidos e este perdura envolvendo a maior extensão do perímetro do embrião não somente durante o desenvolvimento do blastocisto para o embrião e deste para o feto. A reconstituição da organização temporal e espacial durante o desenvolvimento embrionário revelou que a cavidade da blastocele inicialmente revestida somente pelo TM-ECL positiva é tardiamente adicionada por uma camada de endoderma extra-embrionário transformando a blastocele em cavidade do saco vitelino e a sua parede em placenta vitelina. Esta placenta vitelina mantém ao longo da gestação o revestimento externo pelas TM-ECL positivas. Como em outros animais, na parede do saco vitelino inicia-se a hematopoese e angiogênese extra-embrionário e mais tardiamente a cavidade do saco vitelino colaba enquanto a da cavidade amniótica aumenta e a membrana amniótica funde-se com a do saco vitelino que perdura até o final da gestação.

Ressalte-se também que este TM ECL positivo está presente na área das duas massas celulares internas no blastocisto pós-eclosão e acompanha o crescimento destas massas celulares nos dois pólos opostos perfazendo o revestimento mais externo. No desenvolvimento do cone ectoplacentário este perdura como uma camada contínua até o 12º dg, quando ocorrem pequenas áreas de descontinuidade, por onde extravasam as células trofoblásticas gigantes e os sinciciotrofoblastos que invadem o endométrio. Deduz-se portanto que estas células TM-ECL positivas que revestem externamente o embrião até esta fase, controla também a invasividade das células trofoblásticas destes animais. Isto é, as células TM-ECL positivas em si não apresentam comportamento invasivo, o que contraria os relatos de outros roedores como o de camundongos e ratos, os quais as células trofoblásticas murais e ab-embrionária rapidamente se diferenciam em células gigantes (ou sinciciais em humanos) com alta capacidade invasiva.

Este conjunto de resultados demonstram que o blastocisto e o desenvolvimento embrionário do cobaio é substancialmente diferente daqueles conhecidos em outros mamíferos. Notadamente, esta lacuna foi decorrente de uma interpretação equivocada dos relatos pioneiros, mas que não fora questionada até este momento. Entende-se que uma das razões da interpretação equivocada deve-se à ausência de marcadores celulares específicos, aliada à complexidade do conjunto de fenômenos que ocorrem simultaneamente durante a embriogênese.

Neste sentido o estudo pormenorizada obtendo amostras em intervalos diários para acompanhar a dinâmica temporal do fenômeno foi crucial, aliada a uma técnica simples porém trabalhosa que é a obtenção de cortes seriados para a reconstituição espacial do desenvolvimento embrionário teve também, a dose de sorte de deparar com um marcador como a lectina *Erythrina cristagalli* que permitiu decifrar o enigma da placenta vitelina invertida.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Cumprе salientar a dificuldade de se reconstituir a totalidade da interface materno-fetal em dias mais avançados da gestação, onde o tamanho do embrião aumenta substancialmente e ainda com um trajeto irregular orientado aparentemente pela direção original inclinada da luz uterina (de passo helicoidal) ocupando toda a extensão no sentido anti-mesometrial para mesometrial, torna a reconstituição tridimensional mesmo em cortes seriados, uma tarefa difícil. De fato, mesmo antes de 13 dias de gestação, é impossível contemplar no mesmo corte toda a extensão do embrião, exigindo sempre obter cortes longitudinais ou transversais seriados a partir de uma extremidade e prosseguir por toda a extensão de profundidade, sem que se corra o risco de perder parte do embrião, uma vez que não há uma região correspondente ao “centro” de implantação.

Invariavelmente, pelos cortes seriados constata-se que o embrião após o 8º dg torna-se um cilindro longo que atravessa a extensão do endométrio no sentido mesometrial-anti-mesometrial com curvaturas ditadas pelo trajeto original da luz uterina. O trajeto da luz uterina em si do cobaio é diferente dos descritos comumente para os roedores de laboratório (ratos e camundongos), o que resultou em perdas de amostras nos experimentos iniciais decorrente da inesperada orientação do concepto no interior do útero gestante.

Pela análise dos períodos iniciais da gestação acompanhando o desenvolvimento do embrião, desde o blastocisto pré-implantacional até a consolidação dos folhetos embrionários no início da embriogênese, constata-se que o desenvolvimento embrionário deste animal é incomum. O simples fato do desenvolvimento do cone ectoplacentário estar desvinculado da massa embrioblástica que dá origem aos folhetos embrionários, traduz-se em reconsiderar todos os movimentos morfogenéticos na formação das primeiras cavidades intra e extra-embrionárias que orientam a embriogênese. Na embriogênese de camundongos, forma-se inicialmente apenas uma massa celular interna, cuja cavitação separa de um lado os embrioblastos que formarão o hipoblasto e desta os demais folhetos embrionário

voltado para a cavidade da blastocela e do outro lado, os precursores dos trofoblastos que originarão o cone ectoplacentário. No cobaio, ocorre também a cavitação no interior da massa celular da qual diferenciará o epiblasto, porém a cavidade formada já constitui a cavidade pré-amniótica com a formação da membrana amniótica em contato com a cavidade da blastocela. Isto é, a cavidade amniótica que surge tardiamente na embriogênese de camundongos, é um dos primeiros movimentos morfogenéticos no embrião de cobaio. Desta forma, o presente estudo demonstra de forma inédita a formação de duas populações distintas localizados em pólos distintos no interior do blastocisto, onde uma dará origem aos embrioblastos e a outro de trofoblastos que dará origem ao cone ectoplacentário. O revestimento interno da cavidade da blastocela pelo endoderma parietal formando a placenta vitelina é um evento precoce que ocorre muito antes da formação da cavidade pré-amniótica, porém em cobaios, verifica-se um crescimento exacerbado da cavidade da blastocela nos períodos iniciais e o seu revestimento interno pelo endoderma extra-embriônico (parietal) é um evento tardio, posterior à formação da cavidade amniótica. Este fenômeno de revestimento tardio da blastocela pelo endoderma parietal formando a placenta vitelina pode estar relacionado com o paradigma da placenta vitelina invertida, onde se presume a destituição do revestimento trofoblástico. Pelos estudos realizados até o momento, os indícios são de que o revestimento trofoblástico do cório vitelino é permanente, sendo pouco provável a sua destituição com exposição da endoderme parietal ou visceral junto ao tecido materno. Neste particular, a lectina ECL mostrou-se altamente seletivo para a identificação destas células trofoblásticas que perfazem o revestimento do cório-vitelino, o qual pelas análises ao longo da gestação são oriundas da linhagem de trofoblasto que faz revestimento do blastocisto desde o momento da sua eclosão.

Saliente-se ainda que a presença do revestimento de trofoblasto ECL positivo no perímetro externo do cone ectoplacentário tem uma importante função no controle da expansão das células trofoblásticas que constituirão a placenta definitiva. Aparentemente, apenas após a solução de continuidade deste revestimento trofoblástico ECL positiva, o processo de invasividade dos demais trofoblasto tem início na região do cone ectoplacentário. Este mesmo trofoblasto ECL positivo após o 13º dg, destaca-se da superfície do cone ectoplacentário e inserem-se como

pequenas células isoladas no interior do endométrio mesometrial, Pela peculiaridade fenotípica e comportamental, estudos pormenorizados sobre o destino desta células devem ser ainda realizados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria e editora Revinter Ltda, 2002. 544 p.

AMOROSO, E. C. Placentation. In: PARKES, A. S. **Marschall's, physiology of reproduction**. 3. ed. London: Longmans, Green & Co, 1952.

ANDONIOU, C. E.; ANDREWS, D. M.; DEGLI-ESPOSTI, M. A. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. **Immunology**, v. 214, p. 239-250, 2006.

ANDONIOU, C.; DOMMELEN, S. H.; VOIGT, V.; ANDREWS, D.; BRIZARD, G.; ASSELIN-PATUREL, C.; DELALE, T.; STACEY, K.; TRINCHIERI, G.; DEGLI-ESPOSTI, M. A. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. **Nature immunology**, v. 6, p. 1011-1019, 2005.

ASHKAR, A.; CROY, B. A. Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 493-502, 1999.

ASKELUND, K.; LIDDELL, H. S.; ZANDERIGO, A. M.; FERNANDO, N. S.; KHONG, T. Y.; STONE, P. R.; CHAMLEY, L.W. CD83⁺ dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. **Placenta**, v. 25, p. 140-145, 2004.

ATTWOOD, H. D.; PARK, W. W. Embolism to the lungs by trophoblast. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth**, v. 68, p. 611-617, 1961.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

BISCHOFF, T. L. W. Entwicklungsgeschichte des meerschweinchens. Diss. Univ. Giessen, 1852.

BLOIS, S. M.; ALBA SOTO, C. D.; TOMETTEN, M.; KLAPP, B. F.; MARGNI, R. A.; ARCK, P. C. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1018-1023, 2004.

BONATELLI, M.; CARTER, A. M.; MACHADO, M. R.; OLIVEIRA, M. F.; LIMA, M. C. de; MIGLINO, M. A. Placentation in the paca (Agouti paca, Linnaeus, 1966). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, 2005. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15737234>>. Acesso em: 18 ago. 2006.

BORG, C.; JALIL, A.; LADERACH, D.; MARUYAMA, K.; WAKASUGI, H.; CHARRIER, S.; RYFFEL, B.; CAMBI, A.; FIGDOR, C.; VAINCHENKER, W.; GALY, A.; CAIGNARD, A.; ZITVOGEL, L. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. **Journal of Blood Medicine**, v. 104, n. 10, p. 3267-3275, 2004.

CARAUX, A.; LU, Q.; FERNANDEZ, N.; RIOU, S.; DI SANTO, J. P.; RAULET, D. H.; LEMKE, G.; ROTH, C. Natural Killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. **Nature Immunology**, v. 7, n. 7, p. 747-754, 2006.

CLARK, D. A.; ARCK, P. C.; CHAOUAT, G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 1, p. 5-22, 1999.

CREIGHTON, C. On the formation of the placenta in the guinea-pig. **Journal of Anatomy and Physiology**, v. 12, p. 534-590, 1878.

CROY, B. A.; ASHKAR, A. A.; FOSTER, R. A.; DiSANTO, J. P.; MAGRAM, J.; CARSON, D.; GENDLER, S. J.; GRUSBY, M. J.; WAGNER, N.; MULLER, W.; GUIMOND, M. J. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. **Journal Reproduction Immunology**, v. 35, p. 111-133, 1997.

CROY, B. A.; HE, H.; ESADEG, S.; WEI, Q.; McCARTNEY, D.; ZHANG, J.; BORZYCHOWSKI, A.; ASHKAR, A. A.; BLACK, G. P.; EVANS, S. S.; CHANTAKRU, S.; van den HEUVEL, M.; PAFFARO JR, V. A.; YAMADA, A. T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling. **Reproduction**, v. 126, p.149-160, 2003.

CROY, B. A.; LINDER, K. E.; YAGER, J. A. Primer for non-immunologists on immune-deficient mice and their applications in research. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 4, p. 300-313, 2001.

CROY, B. A.; STEWART, C. M.; McBEY, B. A; KISO, Y. An immunohistologic analysis of murine uterine T cells between birth and puberty. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 23, n. 3, p. 223-233, 1993.

CROY, B. A.; ZHANG, J.; TAYADE, C.; COLUCCI, F.; YADI, H.; YAMADA, A.T. Analysis of uterine natural killer cells in mice. In: CAMPBELL, K. S. **Natural Killer Cell Protocols**. Philadelphia: Human Press, 2010. p. 465-503.

CROY, B. A.; YU, Z. M.; KING, G. J. A review of the natural killer cell lineage in the uterus of the mouse and of the pig. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 9-15, 1994. Supplementum 3.

DAVIDOFF, M. Guinea pig placenta: fine structure and development. *Acta Anatomica*, v. 86, p. 23-46, 1973. Supplementum 1. **Adicionar na discussão**

DAVIDOFF, M.; SCHIEBLER, T. H. Feinbau der reifen Meerschweinchenplacenta. [Fine structure of the mature guinea pig placenta]. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 130, p. 216-233, 1970.

DAVIES, B. J.; DEMPSEY, E. M.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea pig: an electron microscopic study. **Journal of Anatomy**, v. 95, n. 4, p. 457-475, 1961a.

DAVIES, B. J.; DEMPSEY, E. M.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea pig: development, histology and histochemistry. **Journal of Anatomy**, v. 95, n. 4, p. 457-475, 1961b.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, D. H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, n. 2-3, p. 194-202, 2000.

DIETL, J.; HÖNIG, A.; KÄMMERER, U.; RIEGER, L. Natural Killer cells and dendritic cells at the human feto-maternal interface: an effective cooperation? **Placenta**, v. 27, p. 341-347, 2006.

DISSE, J. Die Eikammer bei Nagern, Insektivoren und Primate. *Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch.* v. 15, p. 530-580, 1905.

DUVAL, M. Le placenta des rongeurs IV. Le placenta du cochon d'Inde. *J . Anat. (Paris)* v. 28, p. 58-408, 1891.

ELLIS, S. A. MHC studies in domestic animals. **European Journal of Immunogenetics**, v. 21, n. 3, p. 209-215, 1994.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial hemochorial placentas. **The American journal of anatomy**, v. 116, p. 29-68, 1965.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. **Journal of Anatomy**, v. 125, n. 1, p. 1-29, 1969.

FERLAZZO, G.; PACK, M.; THOMAS, D.; PALUDAN, C.; SCHMID, D.; STROWIG, D.; BOUGRAS, G.; MULLER, W. A.; MORETTA, L.; MUNZ, C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human Natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16606-16611, 2004.

GEROSA, F.; BALDANI-GUERRA, B.; NISII, C.; MARCHESINI, V.; CARRA, TRINCHIERI, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 3, p. 327-333, 2002.

GRECO, M. A.; WIECZOREK, R.; SACHDEV, R.; KAPLAN, C.; NUOVO, G.J.; DEMOPOULOS, R. I. Phenotype of villous stromal cells in placentas with cytomegalovirus, syphilis, and nonspecific villitis. **The American Journal of Pathology**, v. 14, n. 1, p. 835-842, 1992.

GROSSER, O. Frühentwicklung, eihautbildung und placentation des menschen und der säugetiere. In_____: **Deutsche Frauenheilkund. Geburtshilfe, Gynäkoilogie und Nachbargebiete in Einzeldar-stellungen**. München: J. F. Bergmann, 1927.

GROSSER, O. Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihäute und der placenta. Wien und Leipzig: Wilhelm Braumüller, 1909.

GUIMOND, M.; WANG, B.; CROY, B. A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg ϵ 26 mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 2, p. 217-223, 1998.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 47, p. 121-130, 1997.

HENSEN, V. Beobachtungen über die Befruchtung mit Entwicklung des kaninchens und Meerschweinchens. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 1, p. 213-273, 1876.

HENSEN, V. Ein frühes Stadium des im Uterus des Meerschweinchens festgewachsenen Eies (Ableitung der Umkehrung der Keimblätter). Arch. Anat. Physiol., Anat. Abt. 60-70, 1883.

HERRMANN, E.; STOLPER, L. Zur Syncytiogenese beim Meerschweinchen. Sitzungsber. D. Kais. Akad. D. Wiss. Math. Naturwiss. Kl. Abtl. III, 114, 1905.

HERRMANN, E.; STOLPER, L. Ein Beitrag zur Entwicklung des Meerschweinchens. Verh. Dtsch. Gynäk. Gesch., p.1903, 1904.

HIBY, S. E.; KING, A.; SHARKEY, A. M.; LOKE, Y. W. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. **Molecular Immunology**, v. 34, n. 5, p. 419-430, 1997.

JANIÁK, M. I. **Das endokrine System bei der Fortpflanzung der Versuchs- und Nutztiere und des Menschen**. Hannover: Schaper 1971.

JURETIC, K.; STRBO, N.; BOGOVIC, C. T.; LASKARIN, G.; RUKAVINA, D. Na insight into the dendritic cells at the maternal-fetal interface. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 350-355, 2004.

KÄMMERER, U.; RIEGER, L.; KAPP, M.; DIETL, J.; RUCK, P. Immunocompetent cells in the endometrium of fetuses and children. **Human Reproduction**, v. 18, n. 5, p. 969-975, 2003.

KAUFMANN, P. Die Meerschweinchenplacenta und ihre entwicklunz. [Guinea pig placenta and its development]. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 129, n.1, p. 83-101, 1969.

KAUFMANN, P.; DAVIDOFF, M. The guinea pig placenta. **Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology**, v. 53, n. 2, p. 5-91, 1977.

KING, B. A . Comparative anatomy of the placental barrier. **Bibltuca anatomical**, n. 6, p.13-28, 2000.

KING, A. Uterine leucocytes and decidualization. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 1, p. 28-36, 2000.

KING, A.; BURROWS, T. D.; HIBY, S. E.; BOWEN, J. M.; JOSEPH, S.; VERMA, S.; LIM, P. B.; GARDNER, L.; BOUTELLER, P. Le; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; LOKE, Y. W. Surface expression of HLA-C human extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 21, p. 376-387, 2000.

KING, A.; WOODING, P.; GARDNER, L.; LOKE, Y.W. Expression of perforin, granzymes A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. **Human Reproduction**, Oxford-England, v. 8, n. 12, p. 2061-2067, 1993.

KOOPMAN, M.; CAMBI, A.; BAKKER, B. I. de; JOOSTEN, B.; FIGDOR C. G.; van HULST, N. F.; GARCIA-PARAJO, M. F. Near-field scanning optical microscopy in liquid for high resolution single molecule detection on dendritic cells. **FEBS Letters**, v. 27, n. 573, p. 6-10, 2004.

LANIER, L. L. NK cell receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 359-393, 1998.

LEE, R. G.; CLARK, D. A. Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. **Bailliers Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 5, n. 1, p. 25-59, 1991.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 830-838, 2006.

LIANG, S.; WEI, H.; SUN, R.; TIAN, Z. IFN-alpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. **Cytokine**, v. 23, p. 190-199, 2003.

LINNEMEYER, P. A.; HAMILTON, M. S. A monoclonal antibody, 4H12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine decidua. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 17, n. 3, p. 279-294, 1990.

LOZA, M. J.; PERUSSIA, B. Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN. **International Immunopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 23-32, 2004.

MIGLINO, M. A.; CARTER, A. M.; AMBROSIO, C. E.; BONATELLI, M.; OLIVEIRA, M. F. de; SANTOS, R. H.; FERRAZ, R. F.; RODRIGUES, R. F.; SANTOS, T. C. Vascular organization of the hystricomorph placenta: a comparative study in agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. **Placenta**, v. 25, p. 438-448, 2004.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 8, p. 584-594, 2006.

MOFFETT-KING, A. Natural Killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 656-663, 2002.

MOSSMAN, H. W. Lagomorpha and Rodentia. In:_____. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. p. 216-249.

MUKHTAR, H.; BIK, D. P.; RUZICKA, T.; MERK, H. F.; BICKERS, D. R. Cytochrome P-450-dependent omega-oxidation of leukotriene B4 in rodent and human epidermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, n. 2, p. 231-235, 1989.

MÜLLER, G.; FISCHER, W. M. Über den fetalen und maternen Beutkreislauf in Der Meerschweinchenplacenta. *Anat. Anz. Erg. Heft.* v. 121, p. 231-239, 1968.

NANAEV, A.; CHWALISZ, K.; FRANK, H. G.; KOHNEN, G.; HEGELE-HARTUNG, C.; KAUFMANN, P. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. **Cell and Tissue Research**, v. 282, n. 3, p. 407-421, 1995.

NELSON, J. L.; HUGHES, K. A.; SMITH, A. G. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 7, p. 466-471, 1993.

PAFFARO JR, V. A.; BIZINOTTO, M. C.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v. 24, p. 479-488, 2003.

PARR, E. L.; YOUNG, L. H. Y.; PARR, M. B.; YOUNG, J. D. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer like cells that contain perforin and serine esterases. **The Journal of Immunology**, v. 145, p. 2365-2372, 1990.

PICCIOLI, D.; SBRANA, S.; MELANDRI, E.; VALIANTE, M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by Natural killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 3, p. 335-341, 2002.

PYTLER, R.; STRASSER, H. Die vorgänge im Meerschweincheneuterus der Inokulation bis zur Bildung des Plazentardiskus. *Z. Gest. Anta.* 76, 386-420, 1925.

REDLINE, R. W.; LU, C. Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. **Laboratory Investigation**, v. 61, n. 1, p. 27-36, 1989.

REICHERT, C. B. Über die Bildung der hinfälligen Häute der Gebärmutter und deren Verhältnisse zur Placenta uterine. *Müllers Arch.* 1948.

SÁNCHEZ, J.; BUENDÍA, A. J.; SALINAS, J.; BERNABÉ, A.; RODOLAKIS, A.; STEWART, I. J. Murine granulated metrial gland cells are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection in vivo. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 3897-3900, 1996.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 73-94, 2003.

SPIEGEL, A. **Versuchstiere : eine Einführung in die Grundlagen ihrer Zucht und Haltung**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1976. 97 p.

STEWART, I. A morphological study of granulated metrial gland cells and trophoblast cells in the labyrinthine placenta of the mouse. **Journal of anatomy**, v. 139, n. 4, p. 627-638, 1984.

STEWART, I.; PEEL, S.; WEBSTER, A. J. A study of natural cytotoxic (NC) activity in the metrial glands of rats and mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 44, n. 4, p. 394-400, 1996.

TRINCHIERI, G. Biology of Natural Killer cells. **Advances in Immunology**, v. 47, p. 187-376, 1989.

VERMA, S.; KING, A.; LOKE, Y. W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. **European Journal of Immunology**, v. 27, p. 979-983, 1997.

VOLLRATH, L. Das Enzymmuster der Meerschweinchenplacenta und seine Veränderungen im Verlauf der Schwangerschaft. **Histochemie**, v. 4, n. 5, p. 397-419, 1965.

WU, X.; WEI, H.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 3, p. 131-137, 2006.

APÊNDICE

Figura 1 – Esfregaço vaginal representativo do ciclo estral do cobaio. A) Diestro: Predominância de células superficiais basófilas entremeadas com menor proporção de células superficiais acidófilas. B) Proestro: predominância de células intermediárias acidófilas e algumas basófilas. C) Estro: Células acidófilas em meio ao muco que prejudica a coleta de células. D) Mestaestro: presença de leucócitos em grande quantidade em meio às células epiteliais intermediárias acidófilas. (E-F) Esfregaço vaginal na fase de metaestro com presença de espermatozóide a fresco com (E) e sem (F) presença de espermatozóides (setas).

DIESTRO

PROESTRO

ESTRO

METAESTRO

METAESTRO: pós-cópula
Coloração de Shorr

METAESTRO: pós-cópula
A fresco sem coloração

Figura 2 – Cobaia não gestante. A) Corte longitudinal da porção mediana de um corno uterino mostrando o trajeto oblíquo da luz uterina da região mesometrial (M) para anti-mesometrial (AM) ao longo do endométrio. B) Corte transversal do corno uterino mostrando a luz uterina ocupando toda a extensão do endométrio com curvatura na região mesometrial (M) e anti-mesometrial (AM) decorrente do passo helicoidal do seu trajeto. (C-G) Detalhes da parede uterina com o seu epitélio colunar simples (seta) e tecido conjuntivo do estroma endometrial (*) (C,D,F) tanto na região mesometrial (C,D) quanto anti-mesometrial (E,G) e o miométrio de tecido muscular liso com os estratos circular interno (#) e longitudinal (►) externa intercalado pelo estrato vascular (★) (E,G). glândulas tubulosas simples (seta cabeça redonda)

Figura 3 - Reações citoquímicas de ácido periódico Shiff - PAS (A,B) e Azul de Toluidina – AT (C-H). A citoquímica de PAS não identificou populações celulares com reatividade seletiva ou específica para qualquer componente tecidual ou células do compartimento embrionário (A) ou do útero (B) nos períodos de gestação analisados; assim como a AT não identificou células ou componentes da matriz extracelular com metacromasia nos tecidos embrionários (C,D) ou no endométrio (E,F) do útero gestante de cobaio. (G,H) Reação controle para AT em corte histológico de língua de camundongo mostrando mastócitos (setas) com grânulos metacromaticos e basofilia sem metacromasia nas células epiteliais de revestimento da língua, respectivamente.

Figura 4 - Fotomicrografias ilustrativas do padrão da reação citoquímica com um painel de lectinas reveladas pela peroxidase no útero de cobaia gestante. (A-C) Lectina ECL: marcação seletiva na superfície das células trofoblásticas murais (A,B) e nos trofoblastos vilosilosos da base do cone ectoplacentário (C). (D-F) Lectina GSL: marcação dos leucócitos presentes no endométrio antimesometrial (D) e do endométrio mesometrial em degeneração (E-F). (G-I) Lectina VVL: marcação nos interstícios do endométrio degenerado da região mesometrial (G) e no perímetro das células decíduais (H) e, nas células trofoblásticas murais do cone ectoplacentário (I). (J-L) Lectina SBA: marcação no perímetro das células decíduais íntegras (J) e em degeneração (K) e, nos trofoblastos vilosos do cone ectoplacentário (L). (M-O) Lectina DBA: Intensa marcação em diversas células e compartimentos da interface materno fetal.

ECL

GSL

VVL

SBA

Figura 5 - Fotomicrografias ilustrativas do padrão da reação citoquímica com um painel de lectinas reveladas pela peroxidase no útero de cobaia gestante. (A-C) Lectina DSL: Intensa marcação positiva sem especificidade em diversos compartimentos e células da interface materno-fetal. (D-F) Lectina JL: marcação difusa nos interstícios do estroma endometrial em degeneração (D) e decídua (E) e no endoderma parietal (F). (G-I) Lectina STL: marcação difusa no interstício do endométrio em degeneração (G) e na decídua (H) e nas células trofoblásticas do cone ectoplacentário (J). (K-N) Lectina LEL: marcação inespecífica com reação positiva nas células deciduais em degeneração (K), deciduais do mesométrio (L), trofoblastos (M) e hemácias e leucócitos (N).

DBA

DSL

JL

STL

LEL

Figura 6 - Fotomicrografias da reação imunocitoquímica para um painel de anti-citoqueratinas. A) Anti-CK7: marcação específica para trofoblastos sem distinção das subpopulações presentes no cone ectoplacentário, inclusive nos sinciotrofoblastos (seta). B) Anti-CK20: reação positiva para as populações de trofoblastos e nas células decíduais. C) Anti-CK34: Fraca reação nas células trofoblásticas e nas células decíduais da região antimesometrial. D) Anti-CK35: padrão de reação semelhante ao da anti-CK34. E) Anti-CK clone AE1 e AE2: intensa marcação inespecífica com reações nos trofoblastos, nas células do endométrio e embrionárias.

CK7

CK20

CK 34

CK 35

AE1 e AE2

Figura 7 - Útero no 6ºdg. A Fotomicrografia de pequeno aumento mostrando um segmento do corno uterino em corte longitudinal com um sítio de implantação embrionária. (B-D) Seqüência de cortes histológicos seriados, mostrando o blastocisto com dimensão em torno de 45µm no interior da luz uterina. (E-F) Detalhe da série anterior com o blastocisto ainda com a sua zona pelúcida (seta) e uma ampla cavidade da blastocèle (Bc) revestida pelo trofotoderma (T). Notar agregados de células embrioblasticas (Em) na porção inferior à direita em (E) e um outro conjunto de agregados de células tronco trofoblastica (TS) na porção superior esquerda em (F,G).

Figura 8 - Útero no 7ºdg. A) Fotomicrografia de um segmento do corno uterino em corte longitudinal seriado com um sítio de implantação uterina identificada histologicamente pela reação decidual e ausência da luz uterina na proximidade. (B-E) Detalhes do sítio de implantação embrionária mostrando segmentos do blastocisto alongado, formado por um maciço de células tronco trofoblasticas (TS) voltada para a região mesometrial (C) e um maciço de células embrionárias (Em) para a região anti-mesometrial (E) intercalados por um delgado cilindro (*) correspondente à cavidade da blastocele (D). O endométrio ao longo do blastocisto mostra-se compactada com células decidualizadas e destituída do revestimento epitelial. Notar que o trofoblasto mural (TM) é lectina ECL positiva.

Figura 9 - Útero no 8ºdg. A) Corte longitudinal do útero gestante mostrando dois sítios de implantação (cabecas de seta) com extensa área do estroma decidualizado ao redor do embrião em desenvolvimento intercalados por áreas de inter-implantação (*) com estroma endometrial não decidualizado. (C-H) Seqüências de três cortes semi-seriados mostrando detalhes e dimensões do embrião cilíndrico com a massa celular embrioblástica (Em) revestida por uma monocadama de trofoblasto lectina ECL positiva (C,F) localizada na região anti-mesometrial do útero. Notar neste momento que nesta o trofoblasto mural não está em contato direto com as células endometriais devido a um artefato de retração, onde vemos nitidamente o alongamento do blastocisto. (B,E) A longa cavidade da blastocèle, é revestida por trofoblasto mural com células pavimentosas lectina ECL positiva, em íntimo contato com o estroma decidualizado. (D,G) A área abembrionária do blastocisto com o maciço de células tronco trofoblásticas (TS) cuja camada mais externa de trofoblasto pavimentoso-ECL positiva, está em íntimo contato com o endométrio.

E
09

F

G

Figura 10 - Útero no 9ºdg com o desenvolvimento do blastocisto mais avançado do que o da figura 10. (A-F) Seqüência de cortes semi-seriados, mostrando a massa de embrioblasto localizado na região anti-mesometrial (A) apresentando uma cavitação central (D); intercalado por uma longa cavidade de blastocele (E) ocupando a maior extensão da região mediana e da região mesometrial do útero (B,C). Na extremidade abembrionária localizada na região mesometrial (C), a formação também de uma cavidade (F) para a organização do cone ectoplacentário (CE). (G-L) Organização do blastocisto mostrando em detalhe a cavitação da massa celular de embrioblasto (G,J) que externamente é revestida por monocamada de trofoblasto mural lectina ECL positiva, a qual reveste também toda a extensão da cavidade da blastocele (H,K). Notar que as células trofoblásticas que formavam o assoalho da cavidade formada no cone ectoplacentário, projetam-se para o interior da cavidade recém formada, dirigem-se para o ápice do cone (I) no sentido mesometrial e ampliam a cavidade da blastocele. Cavidade da blastocele (*). Região mesometrial (M). Região anti-mesometrial (AM). Embrioblasto (Emb). Trofoblasto mural lectina ECL positiva (seta)

Figura 11 - Útero no 10º dg. (A-D) Seqüência semi-seriada de cortes transversais mostrando o embrião em desenvolvimento ocupando o endométrio decidualizado na extensão da região anti-mesometrial ao mesometrial. (E-G) Detalhes da região embrionária onde tem início a formação do folheto hipoblastico (♦) em contato com a cavidade pró-amniótica (#) com revestimento externo de trofoblasto mural lectina ECL positiva (seta) (F). Em uma das extremidades do disco embrionário assimétrico (G) conectada com o epiblasto (★) que dá continuidade ao folheto do pólo embrionário o amnioblasto (cabeça de seta) com contato direto com o trofoblasto mural lectina ECL positiva que reveste a cavidade da blastocele. (H-M) Detalhes do cone ectoplacentário (CE) em desenvolvimento na região mesometrial. Notar a expansão laminar das células trofoblásticas localizadas na base da cavidade ectoplacentária para o interior da cavidade e em direção ao ápice do cone (H,K). Externamente a cavidade ectoplacentária (CE) está revestida por uma monocamada de trofoblasto mural (seta) (I) que fazem a interface da cavidade blastocele (*) com o estroma decidualizado (Dec) do útero (H-J). A expansão laminar projeta-se para o ápice do cone ectoplacentario (CE) (K), formando uma longa protuberância de células trofoblásticas na maioria poligonais, ocasionalmente formando uma massa sincicial (seta cabeça redonda) revestida por células trofoblásticas murais lectina ECL positiva (seta) (L,M). Região anti-mesometrial (AM). Região mesometrial (M). Célula trofoblastica mural lectina ECL positiva (seta). Cavidade pró-amniótica (#). Cavidade da blastocele (*). Folheto hipoblastico (★).

Figura 12 - Sítio de implantação embrionária no 11ºdg. (A-B) Corte transversal do útero mostrando a extensão do endométrio ocupado pelo crescimento em comprimento da blastocele. B) Região da base do cone ectoplacentário em contato com a blastocele (Bc) mostrando a presença de lacunas (*) no eixo laminar de células trofoblásticas pequenas com o início de ramificações. Notar que o perímetro externo desta lamina de trofoblasto pequeno é ainda revestida pelo trofoblasto mural (cabeça de seta) contínua com aquelas que revestem a blastocele. O endométrio (#) em contato e próximo ao cone ectoplacentário apresenta-se desestruturado com as células decíduais em degeneração. (C,D,F,G) Região do ápice do cone ectoplacentário agora apresenta áreas de descontinuidade da camada de células trofoblásticas murais ECL positivas (cabeça de seta). E) Região da base do cone ectoplacentário em contato com a blastocele (Bc) mostrando a presença de lacunas (*) no eixo laminar de células trofoblásticas pequenas com o início de ramificações. Notar que o perímetro externo desta lamina de trofoblasto pequeno é ainda revestida pelo trofoblasto mural (cabeça de seta) contínua com aquelas que revestem a blastocele. O endométrio (#) em contato e próximo ao cone ectoplacentário apresenta-se desestruturado com as células decíduais em degeneração.

Figura 13 - Sítio de implantação embrionária no 11ºdg (A-F) com detalhes da área do cone ectoplacentário (CE) em desenvolvimento. B) Região da base do cone ectoplacentário em contato com a blastocele (Bc) mostra a presença de lacunas sangue (seta) no eixo laminar de células trofoblásticas pequenas (*) com o início de ramificações. Notar que o perímetro externo desta lamina de trofoblasto pequeno é ainda revestido pelo trofoblasto mural lectina ECL positiva (cabeça de seta) contínua com aquelas que revestem a blastocele. O endométrio (Dec) em contato e próximo ao cone ectoplacentário apresenta-se desestruturado com as células decíduais em degeneração. C) Área lateral do cone ectoplacentário (CE) com pequenos trofoblastos delimitados ainda pelo revestimento de trofoblasto mural lectina ECL positiva (cabeça de seta). Nestas áreas não se verificam células trofoblásticas gigantes em processo invasivo. (D-F) Região do ápice do cone ectoplacentário com o eixo laminar de células trofoblásticas pequenas (*) e trofoblastos gigantes (seta) com prolongamentos citoplasmáticos invadindo o endométrio e confinando espaços com sangue materno e células decíduais em degeneração.

Figura 14 - Útero no 12ºdg e 13ºdg. A) Corte transversal do útero evidenciando o embrião (Em) em desenvolvimento na região anti-mesometrial (AM). Ampla cavidade da blastocela (Bc) e o cone ectoplacentário (CE) inserido no endométrio da região mesometrial (M). (B-G) Detalhes do disco embrionário e a relação espacial dos seus folhetos embrionários. Observar a formação da linha primitiva no ectoderma (seta) (B,C) e a ampla cavidade amniótica (*), delimitada pela membrana amniótica (cabeça de seta) (B,E). A camada de endoderma (En) junto a membrana amniótica (cabeça de seta) (E-G). O disco embrionário é trilaminar com a disposição do ectoderma (Ec) em contato com a cavidade amniótica (*), o mesoderma (Ms) com células dispersas abaixo do ectoderma e em contato na outra face com o endoderma (En) voltado para o revestimento de trofoblasto mural (TM) lectina ECL positiva (C,D). Nas bordas do disco embrionário, observa-se a área da junção com a membrana amniótica (cabeça de seta) (B,D,F,G) e a continuidade do endoderma extra-embrionário (En-Ex) revestindo internamente a cavidade blastocela apoiada na camada de trofoblasto mural (TM) ECL positiva (E,F).

Figura 15 - Cone ectoplacentário no 13^ºdg. A) Corte tangencial da lateral do cone ectoplacentário (CE) mostrando o revestimento externo pelo trofoblasto mural (TM) lectina ECL positivo e a cavidade interna que tem continuidade com a blastocele (*). Notar que esta cavidade nesta fase tem o revestimento completo pelo endoderma extra-embriônico (cabeça de seta). (B,C) Detalhe das células trofoblásticas (TM) ECL positivas destacando-se das áreas laterais cone ectoplacentário (CE) e infiltrando-se entre o estroma endometrial. (B,D,E) Invasão do trofoblasto gigante com prolongamentos citoplasmáticos (setas) confinando lacunas de sangue materno, a partir do cone ectoplacentário que ocorre em áreas onde o revestimento pelo trofoblasto mural (TM) ECL positivo está descontínuo. (F) Detalhe da região da base do cone ectoplacentário que se conecta com a cavidade blastocele agora contínua com a cavidade do cone pelo revestimento de endoderma extra-embriônico (cabeça de seta), constituindo nestas áreas a membrana ou placenta cório-vitelina. (G,H) Detalhe das células trofoblásticas mural (TM) lectina ECL positiva da membrana vitelina com microvilosidades. Mesoderma extra-embriônico (seta com cabeça redonda).

Figura 16 – A placenta vitelina. (A-F) Após a formação deste anexo extra-embrionário no 13ºdg (A), permanece até o estágio de 56ºdg (F) sendo sempre constituído de trofoblasto mural (TM) lectina ECL positiva, mesoderma extra-embrionário (*) e endoderma extra-embrionário (seta). Observar a permanência das células trofoblásticas murais TM) ECL positiva constituindo a membrana ou melhor a placenta vitelina.