A microscopic image of a sheep embryo (Ovis aries) in the vitelline sac. The embryo is visible as a small, pinkish, elongated structure with some internal features, surrounded by a large, clear, oval-shaped vitelline sac. The background is a light, yellowish-orange color with some red, fibrous structures.

ALÍCIA GREYCE TURATTI PESSOLATO

**Caracterização das células-tronco do saco vitelino
e análise ultraestrutural da membrana vitelina
de embriões ovinos (*Ovis aries*)**

**São Paulo
2011**

ALÍCIA GREYCE TURATTI PESSOLATO

**Caracterização das células-tronco do saco vitelino
e análise ultraestrutural da membrana vitelina
de embriões ovinos (*Ovis aries*)**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2011

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

25.07.11

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2476
FMVZ

Pessolato, Alicia Greyce Turatti

Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*) / Alicia Greyce Turatti Pessolato. -- 2011.
189 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - 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: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Saco vitelino. 2. Células-tronco hematopoéticas. 3. Células progenitoras endoteliais. 4. Hemangioblasto. 5. Ovinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Alícia Greyce Turatti Pessolato

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

O Presidente da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 1713/2009, intitulado: "Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)", no qual foram utilizados 87 (oitenta e sete) ovelhas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética adotados por esta Comissão e aprovado "ad referendum.

São Paulo, 8 de julho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PESSOLATO, Alícia Greyce Turatti

Título: Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Esta Dissertação é especialmente dedicada ao meu
namorado Eduardo, que apesar de sofrer com a distância
e a saudade, foi a pessoa mais presente e significativa em
minha vida neste período, tornando todos os momentos
desta jornada cheios de cuidado e amor. Amo você!*

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celeste pela graça do conhecimento, paciência, proteção, amparo, determinação e inspiração concedida em todos os momentos.

A meu namorado Eduardo, pela confiança, paciência, apoio, conforto, companheirismo, incentivo, cuidado, carinho e amor. Você foi essencial para o bom desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ser maravilhoso!

À minha mãe Sueli, pelo exemplo de ética e amor que é em minha vida! Obrigada por tudo!

Ao meu pai Jair e à minha irmã Acice pela força, confiança e interesse em todas as etapas deste trabalho e de minha vida. Obrigada por existirem!

À minha avó Benedita pela confiança, amor e por querer aliviar meu fardo.

Às minhas tias e primos, por tornarem mais bonitos e alegres os fins de semana.

À família do meu namorado pela confiança e torcida.

À professora Maria Angélica Miglino pela oportunidade, apoio, confiança, valiosos ensinamentos e por me ensinar empreendedorismo.

Ao professor Dimas Tadeu Covas pela orientação, disponibilidade e imensuráveis apoios nas etapas mais críticas do projeto.

À Dani e ao Cajú pela confiança, liberdade e disponibilidade sempre imediata.

À professora Aparecida Maria Fontes pela abertura do laboratório para me receber, e pela preocupação em fazer o projeto dar certo.

À Mizinha, amiga embriologista, por me fazer amar a Embriologia e chorar profundamente ao dissecar embriões vivos. rs Seu auxílio, companhia de viagens e sua fraterna amizade tornaram o complicado início do Mestrado mais brando de ser vivido e me prepararam para as etapas tumultuadas que se seguiram. Obrigada por ter feito parte disso tudo!

À Nath “Cuore” por segurar em minha mão e me ensinar a pipetar... rsrs Por toda a dedicação a mim despendida, amizade e direcionamentos dados assim que cheguei a Ribeirão. Por seu amparo em procurar aprender o que eu deveria saber para poder me ensinar. Não sei como seria sem sua doada ajuda. Muito obrigada!

À Drizinha linda por me “aperfeiçoar” no cultivo celular, pela segurança, apoio e auxílio oferecido principalmente nas etapas mais sobrecarregadas do trabalho. Obrigada por sua sincera amizade e por me tornar mais segura em relação ao meu próprio conhecimento! Linda!

Aos amigos Galdos, Loris e Ju Passos pela amizade, apoio e companheirismo em todos os meus retornos a São Paulo. Ao Álvaro pelo apreço, companhia, consideração e sincera amizade. Você foi um verdadeiro hermanito! À Lorena por me mostrar e ajudar a aceitar a realidade, por mais cruel que fosse! Pelos ensinamentos e interpretações filosóficas da vida. E à Ju por estar sempre presente, por mais corrido que o momento permitisse.

Aos amigos do laboratório de Transferência Gênica Ferzinha, Marta, Lucas e Ricardo por contribuírem diretamente com preciosos ensinamentos, valorosa amizade e agradável companhia durante todo esse tempo de convívio.

Às amigas Marcela e Danielle pela amizade, conselhos, ensinamentos e auxílios sobre Real Time. Vocês foram fundamentais!

Ao Danilo “barba”, pelos pacientes ensinamentos e direcionamentos no meu período inicial em Ribeirão.

Ao frigorífico MARFRIG Alimentos, pela abertura, imensuráveis auxílios e confiança depositada em minha pesquisa.

À Maria Emilia Franco Oliveira, orientada do professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, da UNESP Jaboticabal, pela colaboração neste projeto principalmente nas avaliações ultrassonográficas para diagnóstico precoce de prenhez. Você foi um anjo sem asas na minha vida! Obrigada pela sua competência e por concordar em participar deste trabalho, mesmo com o tempo escasso.

À FAPESP pela bolsa de Mestrado e pela reserva técnica concedida (Processo #09/03343-0).

Ao INCTC pelo investimento.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pelo acolhimento e incentivo financeiro para as coletas de embriões.

Ao CRUSP e à minha Assistente Social Rosângela Dearo, pelo auxílio moradia.

Às amigas Paula e Giu por me fazerem encarar as dificuldades como única condição de crescimento! Obrigada por existirem!

Às meninas do Apto 21 de Ribeirão: Mayara, Talita, Carolina e Livia. Vocês são as mais cats de todas! Obrigada por tornarem os desafios felizes de serem suportados e pelos brigadeiros de "ovos" que fizeram para me alegrar! Rsrs

Aos motoristas do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela companhia e torcida a cada coleta.

Al Ilustre professor Jaime Pereda Tapiol de la Facultad de Medicina por la Universidad de Santiago de Chile, investigador especialista en el área de Embriología Humana y desarrollo del saco vitelino, por las valiosas discusiones, consejos, consideraciones y aprecio a mi trabajo.

Aos colegas "da sala da professora" André, Marina, Day e Phelipe por sempre me auxiliarem à distância.

Aos secretários Maicon, Jaqueline e Fabiana pela pronta disponibilidade em me ajudar a resolver as "pendências burocráticas".

Aos técnicos Índio do "fundão da Anatomia", Ronaldo do laboratório de Histologia e Embriologia e Diogo do laboratório de Imunohistoquímica pelos auxílios prestados.

À secretária do Dr. Dimas, Bernadete pelo apoio sempre imediato e torcida para que as coletas dessem certo.

A todos os colegas do Hemocentro do laboratório de Biologia Molecular, Dra. Simone Kashima, Evandra e Virgínia pelos auxílios em Real Time; laboratório de Terapia Celular, Dra. Maristela Delgado, Taísa, Karina, Priscilla e Aline pelos auxílios em cultivo; laboratório de Biologia Celular, Dra. Kamilla, Mário e Rô; e laboratório de Citometria de Fluxo, Dra. Patrícia, Kamila, Daiane e Carminha pela amizade, apoio e contribuições dadas para a construção de meu conhecimento.

À querida Josi do laboratório de Histologia do Hemocentro, pela amizade e apoio!

Ao povo brasileiro pelo "patrocínio" inconsciente prestado à Ciência e à Educação brasileira. Fiz o máximo para fazer valer cada centavo pago por vocês!

“Nenhuma dor que sofremos, nenhuma provação que passamos será em vão. (...) Tudo o que sofremos e tudo o que suportamos, particularmente se o fizermos com paciência, edifica nosso caráter, purifica-nos o coração, expande nossa alma e nos torna mais ternos e caridosos, (...) e é por meio da dor e do sofrimento, do trabalho árduo e da tribulação, que obtemos a educação que aqui viemos receber...”

(Orson F. Whitney e Spencer W. Kimball, 1972)

RESUMO

PESSOLATO, A. G. T. **Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)**. [Characterization of stem cells from yolk sac and ultrastructural analysis of the viteline membrane from sheep embryos (*Ovis aries*)]. 2011. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O saco vitelino é o único anexo embrionário presente em todas as espécies dos embriões vertebrados, répteis, aves e mamíferos. Em mamíferos domésticos o saco vitelino é inicialmente grande, pois nestas espécies ele é transitório. Após a implantação, surge no mesênquima lateral à notocorda agrupamentos de células, denominados “ilhas sanguíneas”, que representam os progenitores dos sistemas vascular e hematopoético: os hemangioblastos. Os hemangioblastos centrais das ilhas sanguíneas formam as primeiras células-tronco hematopoéticas, enquanto os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento inicial da atividade hematopoética no saco vitelino conduz a hipótese de que esse tecido é o local primário de desenvolvimento hematopoético e que as células-tronco derivadas dele semeiam os outros sítios intraembrionários. Foi possível observar nas análises microscópicas que realmente existe uma relação entre ambas linhagens. Nas análises de expressão gênica, alguns genes expressos pelo hemangioblasto apresentaram alta expressão nas análises D+0 e outros genes também específicos do hemangioblasto, porém em estágios secundários de diferenciação como os encontrados na região aórtica, a nível de endotélio hemogênico apresentaram altos níveis de expressão após 3 dias em cultivo. Concluímos portanto, que o saco vitelino por ser o local primário de formação das células sanguíneas e endoteliais nos estágios iniciais da embriogênese, por serem primitivas e, portanto não expressarem marcadores de células maduras na sua superfície, tornam estas células uma importante fonte de células-tronco relevante para a Terapia Celular para hemofilia e muitas outras doenças humanas.

Palavras-chave: Saco vitelino. Células-tronco hematopoéticas. Células progenitoras endoteliais. Hemangioblasto. Ovinos.

ABSTRACT

PESSOLATO, A. G. T. **Characterization of stem cells from yolk sac and ultrastructural analysis of the viteline membrane from sheep embryos (*Ovis aries*)**. [Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)]. 2011. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The yolk sac is the single attachment embryo present in all species of vertebrate embryos, reptiles, birds and mammals. In domestic mammals the yolk sac is initially large, since these species it is transient. After implantation, appears in the lateral mesenchyme to the notochord cell clusters, called "blood islands" that represent the progenitors of vascular and hematopoietic systems: the hemangioblasts. The central islands hemangioblasts form the first blood hematopoietic stem cells, while peripheral hemangioblasts, the angioblastic differentiate into the precursors of blood vessels. The initial development of the yolk sac hematopoietic activity leads to the hypothesis that this tissue is the primary site of development and that hematopoietic stem cells derived from them sow other intraembryos sites. It was observed in the microscopic analysis that there is indeed a relationship between the two lineages. In the analysis of gene expression, some genes expressed by hemangioblasts showed high expression in D+0 and other specific genes also hemangioblasts, but in secondary stages of differentiation as found in the aortic region, the level of hemogenic endothelium showed high levels of expression after 3 days in culture. We therefore conclude that the yolk sac to be the primary site of formation of blood and endothelial cells in the early stages of embryogenesis, for its cells be primitive and therefore do not express markers of mature cells on the surface, these cells become an important source of cells relevant to stem cell therapy for hemophilia and many other human diseases.

Keywords: Yolk sac. Hematopoietic stem cells. Endothelial progenitor cells. Hemangioblast. Ovines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 15 dias (CR de 4,1 mm)	68
Figura 2 -	Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 18 dias (CR de 5,8 mm)	69
Figura 3 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 19 dias (CR de 6,4 mm)	70
Figura 4 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 20 dias (CR de 6,4 mm)	71
Figura 5 -	Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 21 dias (CR de 7,7 mm)	72
Figura 6 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 22 dias (CR de A: 8,0 mm; B: 8,7 mm e C: 8,91 mm)	73
Figura 7 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 23 dias (CR de 10,2 mm)	74
Figura 8 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 24 dias (CR de 11,3 mm)	75
Figura 9 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 25 dias (CR de A e B 13,4 mm e C 13,3 mm)	76
Figura 10 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 26 dias (CR de 14,1 mm)	77
Figura 11 -	Fotografias de embrião ovino evidenciando saco vitelino em conexão com a vasculatura coriônica. Idade gestacional estimada de 26 dias (CR de 14,1 mm)	78
Figura 12 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 27 dias (CR de 16,1 mm)	79
Figura 13 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 28 dias (CR de 16,99 mm e 17,43 mm)	80
Figura 14 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 29 dias (CR de 17,8 mm)	81
Figura 15 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 30 dias (CR de A: 18,08mm; B: 19,1mm e C: 19,94mm)	82

Figura 16 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 31 dias (CR de A/B: 19,65mm e C: 20,54mm)	83
Figura 17 -	Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 32 dias (CR de 22,0 mm)	84
Figura 18 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 15 dias	87
Figura 19 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 21 dias	88
Figura 20 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 22 dias	89
Figura 21 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 22 dias	90
Figura 22 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 23 dias	91
Figura 23 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 23 dias	92
Figura 24 -	Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 25 dias	93
Figura 25 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	95
Figura 26 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	96
Figura 27 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	97
Figura 28 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	98
Figura 29 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	99
Figura 30 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	100
Figura 31 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias	101
Figura 32 -	Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 26 dias	102

Figura 33 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 26 dias	103
Figura 34 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias	104
Figura 35 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias	105
Figura 36 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias	106
Figura 37 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias	107
Figura 38 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 29 dias	108
Figura 39 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 29 dias	109
Figura 40 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	112
Figura 41 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	113
Figura 42 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	114
Figura 43 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	115
Figura 44 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	116
Figura 45 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	117
Figura 46 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	118
Figura 47 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	119
Figura 48 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	120
Figura 49 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias	121

Figura 50 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.....	122
Figura 51 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.....	123
Figura 52 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	124
Figura 53 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	125
Figura 54 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	126
Figura 55 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	127
Figura 56 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	128
Figura 57 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	129
Figura 58 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	130
Figura 59 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	131
Figura 60 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.....	132
Figura 61 - Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.....	134
Figura 62 - Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.....	135
Figura 63 - Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.....	136
Figura 64 - Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.....	137
Figura 65 - Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.....	138
Figura 66 - Fotomicrografias das células totais do saco vitelino após 2 dias em cultivo.....	141

Figura 67 - Fotomicrografias das células do saco vitelino cultivadas em suspensão	142
Figura 68 - Fotomicrografias das células aderentes do saco vitelino	143
Figura 69 - Fotomicrografias das células aderentes do saco vitelino	144
Figura 70 - Fotomicrografias das células do saco vitelino no ensaio de metilcelulose D+1	146
Figura 71 - Fotomicrografias das células do saco vitelino no ensaio de formação de vasos rudimentares <i>in vitro</i>	148
Figura 72 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células do saco vitelino ovino.....	150
Figura 73 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células do saco vitelino ovino.....	151
Figura 74 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano	152
Figura 75 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano	153
Figura 76 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano e das células do saco vitelino ovino	154
Figura 77 - Ensaio angiogênico <i>in vivo</i> das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano e das células do saco vitelino ovino	155
Figura 78 - Imunofenotipagem das células vitelinas aderentes por citometria de fluxo	156
Figura 79 - Fracionamento das amostras de RNA total extraído das membranas vitelinas de diferentes idades embrionárias.....	158
Figura 80 - Fracionamento das amostras de RNA total extraído das células vitelinas cultivadas de diferentes idades embrionárias	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estimativas das idades embrionárias coletadas adaptadas a partir da literatura consultada	53
Tabela 2 -	Total de coletas realizadas, úteros coletados e quantidade de embriões encontrados	65
Tabela 3 -	Média e desvio padrão da marcação por citometria de fluxo das células vitelinas aderentes	157
Tabela 4 -	Média e desvio padrão da marcação por citometria de fluxo das células vitelinas não aderentes	157

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição e período de utilização de diferentes meios para o cultivo de células do saco vitelino	57
Quadro 2 - Sequências dos primers sintetizados e utilizados nas reações de PCR em tempo real	63
Quadro 3 - Contagem total de células obtidas das membranas vitelinas após diferentes tipos de maceração no primeiro cultivo realizado	139

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise de expressão gênica da membrana vitelina D+0 de diferentes idades embrionárias	160
Gráfico 2 - Análise de expressão gênica das células vitelinas de diferentes idades embrionárias cultivadas D+3, D+6 e D+9	161

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGM	Aorta-gonado-mesonefros
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
BL-CFC	Blastic-cell forming colony
BSA	Bovine Serum Albumin
CBF β	Core-binding factor beta subunit
cDNA	Complementar deoxyribonucleic acid
CESH	Células endoteliais sinusoidais hepáticas
CPE	Células progenitoras endoteliais
CR	Crown Rump
CTH	Célula(s)-tronco hematopoética
CTP	Células-tronco pluripotentes
CTSV	Célula(s)-tronco do saco vitelino
DAPI	Dihidrocloreto diamino-2-fenilindol
D+0	Dia 0
D+3	Dia 3
D+6	Dia 6
D+9	Dia 9
DMEM HG	Dulbelcco's Modified Eagle's Medium High Glucose ()
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium
Flk-1	Fetal liver kinase 1
FLT-3	Class III receptor tyrosine kinase
FVIII	Fator VIII
FGF-2	Fibroblast Growth Factor - 2
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HC-FMRP	Hospital das Clínicas-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina Eosina
Ho33342	Hoechst 33342 (corante de ácido nucléico)
HUVEC	Células endoteliais humanas do cordão umbilical
iPS	Induced pluripotent stem cells
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6

IL-7	Interleucina 7
KDR	Kinase insert domain receptor
KSR	Knockout Serum Replacement
Lmo-2	LIM domain only protein 2
M	Molar
MHC	Main Histocompatibility Complex
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
nm	Nanômetro
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/ Severe Combined Immunodeficient
PAS	Esplancnopleura paraórtica
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PROML 1	Prominina transmembrana 1
Rh123	Corante fluorescente rodamina 123
RNA	Ribonucleic Acid
SCF	Stem Cell Factor
SCL	Stem cell leukemia
SCU	Sangue de cordão umbilical
SFB	Soro fetal bovino
SFBi	Soro fetal bovino inativado
SV	Saco Vitelino
Tal-1	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1
TPO	Thrombopoietin
URE	Unidades Relativas de Expressão
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
VEGFR-2	Vascular Endotelial Growth Factor Receptor -2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	255
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVO GERAL	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	31
4.1 MORFOLOGIA DO SACO VITELINO	31
4.1.2 Características morfológicas do saco vitelino	34
4.2 O HEMANGIOBLASTO	38
4.3 HEMATOPOESE.....	41
4.4 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	45
4.5 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS	48
4.6 CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO	50
5 MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	52
5.2 ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	53
5.2.1 Microscopia óptica.....	54
5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	54
5.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	55
5.2.4 Microscopia confocal.....	55
5.3 CULTIVO CELULAR	56
5.3.1 Padronização do cultivo de células do saco vitelino	56
5.3.2 Ensaio de potencial de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose.....	58
5.3.3 Ensaio de formação de vasos rudimentares <i>in vitro</i>	59
5.3.4 Ensaio de formação de vasos rudimentares <i>in vivo</i>	59
5.5 MÉTODOS MOLECULARES	61
5.5.1 Extração do mRNA e síntese do cDNA.....	61
5.5.2 PCR em tempo real	62

6 RESULTADOS	65
6.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS EMBRIÕES E SACOS VITELINOS OVINOS	66
6.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SACO VITELINO	85
6.2.1 Microscopia óptica.....	85
6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	94
6.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	110
6.2.4 Microscopia confocal.....	112
6.3 CULTIVO CELULAR	139
6.3.1 Isolamento das células derivadas do saco vitelino	139
6.3.2 Ensaio de potencial de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose....	145
6.3.3 Ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares <i>in vitro</i>	147
6.3.4 Ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares <i>in vivo</i>	149
6.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS VITELINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	156
6.5 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	157
6.5.1 Análise da integridade das amostras de RNA total	158
6.5.2 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	159
6.5.2.1 Dia 0	159
6.5.2.2 Dia 3, 6 e 9.....	160
7 DISCUSSÃO	162
8 CONCLUSÕES.....	172
REFERÊNCIAS	174
APÊNDICE	188

1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos embriões vertebrados, répteis, aves e mamíferos possuem membranas extra-embriônicas (NODEN; DE LAHUNTA, 1990). No entanto, o saco vitelino é o único anexo embrionário presente em todas as espécies vivíparas e ovíparas (MOSSMAN, 1987).

Latshaw (1987) e Baron (2003) relataram que o saco vitelino de mamíferos domésticos é grande em sua fase inicial, mas regride quando a placenta permanente se desenvolve. Isto ocorre devido ao fato de que em mamíferos domésticos, assim como no homem, o saco vitelino é transitório.

Em humanos, aproximadamente duas a três semanas após a fertilização e implantação do ovo no endométrio, surge no mesênquima lateral à notocorda agrupamentos de células denominados “ilhas sanguíneas”, que representam as células progenitoras endoteliais e hematopoéticas. As células mais externas das ilhas formarão o endotélio e as mais centrais originarão as células sanguíneas e se tornarão livres no lúmen (ZAGO; COVAS, 2006).

Em ruminantes o saco vitelino é grande, vascular e completamente cercado pela cavidade extra-embriônica. Em bovinos, o saco vitelino se solta do cório pelo vigésimo dia de gestação e no vigésimo quinto dia se reduz a uma estrutura sólida na forma de um cordão (LATSHAW, 1987). Em ovinos ocorre também a degeneração das paredes do saco vitelino em um período semelhante (RUSSE et al., 1992).

O saco vitelino, apesar de sua variedade de formatos e relações com as membranas embrionárias e fetais, possui a função primitiva de formar células-tronco multipotentes que são capazes de formar as células sanguíneas e os tecidos das veias, artérias e capilares (BEIGUELMAN, 2000; CHO et al., 2006), através de uma célula precursora de ambas linhagens hematopoética e endotelial que é denominada hemangioblasto (SABIN, 1920; MURRAY, 1932; WAGNER, 1980* apud CHOI et al., 1998; LI; WEI; WAGNER, 1999; JAFFREDO et al., 2005).

A hipótese da existência do hemangioblasto ganhou mais sustentação a partir da observação de que as células das linhagens endoteliais e hematopoéticas compartilhavam a

* WAGNER, R. C. Endothelial cell embryology and growth. **Advances in Microcirculation**, v. 9, p. 45-75, 1980.

expressão de um número variado de genes (FINA et al., 1990; MILLAUER et al., 1993; YAMAGUCHI et al., 1993; ANAGNOSTOU et al., 1994; KALLIANPUR et al., 1994; YOUNG et al., 1995; ASAHARA et al., 1997; KABRUN et al., 1997). Dentre estes genes, pode-se destacar o Flk-1, receptor do VEGF, requerido para o desenvolvimento das ilhas sanguíneas (MANDRIOTA; MENOUD; PEPPER, 1996) e mais seis genes específicos da linhagem hematopoética como o SCL-Tal-1, o Lmo-2, o CBF β , o GATA-3, o CD45 e o Runx-1 (BOLLEROT; POUGET; JAFFREDO, 2005) que também é expresso pelo hemangioblasto em um estágio secundário de diferenciação.

Atualmente, outras teorias afirmam que o hemangioblasto pode gerar células hematopoéticas através de um estágio de endotélio hemogênico (LANCRIN et al., 2009) ou de que as células-tronco hematopoéticas (CTH) originam-se de novo de células mesenquimais (BOLLEROT; POUGET; JAFFREDO, 2005).

Yoshimoto e Yoder (2009) afirmaram recentemente que a relação entre endotélio hemogênico e hemangioblastos nunca foi resolvida e Choi et al. (1998) relataram ainda, que apesar de essas observações serem consistentes com o conceito do hemangioblasto, os mecanismos que controlam sua relação com a hematopoese e a vasculogênese embrionária ainda não são compreendidos (BARON, 2003), nem tampouco provam sua existência (CHOI et al., 1998).

Apesar das divergências acerca do hemangioblasto, a possível existência desta célula precursora comum para ambas as linhagens, possibilita em parte, o entendimento da ocorrência da hematopoese, um processo biológico fundamental para o adequado desenvolvimento embrionário e que tem origem neste primitivo sítio que é o saco vitelino.

A hematopoese constitui-se de um sistema complexo no qual células-tronco, autorenováveis e indiferenciadas, dão origem a células mais diferenciadas que adquirem um fenótipo restrito, e que progressivamente resultam na amplificação e diferenciação de várias linhagens maduras do sistema sanguíneo (FENNIE et al., 1995; JAFFREDO et al., 2005).

O desenvolvimento inicial da atividade hematopoética no saco vitelino conduz a hipótese de que esse tecido é o local primário de desenvolvimento hematopoético e que as células-tronco derivadas dele semeiam os outros sítios intraembriônicos (MOORE; OWEN, 1967). Moore e Owen (1967) afirmaram também que os outros sítios hematopoéticos embrionários não atuam na produção de CTH, apenas estão sujeitos à colonização secundária das células derivadas do saco vitelino, durante o período de atividade do mesmo.

No entanto, durante a ontogenia dos vertebrados, os sítios hematopoéticos se modificaram à medida que surgiram novas populações de células-tronco. No desenvolvimento dos mamíferos, as CTH sequencialmente ocuparam o saco vitelino, o fígado fetal e a medula óssea adulta (NARDI; ALFONSO, 2006).

As células-tronco progenitoras das células sanguíneas foram as primeiras bem caracterizadas, pois na década de 1940 já se sabia que a medula óssea possuía células indiferenciadas capazes de repopular o pool de células maduras que eram eliminadas. No entanto, o conceito de célula-tronco originou-se dos estudos pioneiros de Till e McCulloch em 1961, os quais demonstraram não só a repopulação celular, mas também a reconstituição completa do sistema hematopoético após o transplante de medula óssea de camundongos irradiados letalmente. Estes resultados indicaram a presença, na medula óssea, de células capazes de originar todos os tipos de células sanguíneas *in vivo* (NARDI; ALFONSO, 2006).

Após a confirmação da capacidade de reconstituição hematopoética, um grande interesse surgiu em relação aos diversos tipos de células-tronco adultas encontradas em diferentes órgãos e tecidos. Atualmente, as células-tronco hematopoéticas são melhor caracterizadas e mais utilizadas na medicina como terapia para diversas doenças, pois são células que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema hematopoético continuamente até a morte (GASPER, 2000; HERZOG et al., 2003).

Em contrapartida, outros tipos de células-tronco adultas ou fetais menos conhecidas, mas com um importante potencial terapêutico, podem exercer diferentes funções nas mais distintas situações biológicas existentes. Neste sentido, a hemofilia, uma doença grave com grande relevância clínica, pode ser alvo de intensa investigação.

A hemofilia A é uma desordem sanguínea hereditária ligada ao cromossomo X. Sua principal causa é a deficiência ou anormalidade do fator VIII (FVIII), um cofator necessário para a geração da fibrina. A deficiência do FVIII de coagulação é a forma mais comum de hemofilia, com uma incidência de aproximadamente 1 em cada 5.000 homens e que afeta aproximadamente 400.000 pessoas no mundo (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2006).

O tratamento com FVIII considerado mais adequado para hemofilia A visa fornecer FVIII em quantidade suficiente para prevenir hemorragias espontâneas (profilático) e/ou para obtenção de coagulação normal após um trauma (demanda), entretanto esse tipo de tratamento é caro e frequentemente não satisfatório (POWELL, 2009). Um dos agravantes é o tempo de

meia-vida do FVIII de aproximadamente 8-12 horas (MANCO-JOHNSON et al., 1994) e que dependendo do quadro hemorrágico exige repetidas infusões.

A terapia em uso mundialmente é a reposição de FVIII derivado do plasma ou recombinante, entretanto, apesar da eficácia do tratamento o alto custo e a indisponibilidade relacionados à obtenção dos concentrados de FVIII derivado do plasma e recombinante fazem com que cerca de 70-80% da população de países em desenvolvimento não possuam tratamento ou que o mesmo seja inadequado (ANTUNES, 2002; STONEBRAKER et al., 2010).

No ano de 2007, a Coordenação de Política Nacional de Sangue e Hemoderivados (CPNSH) traçou um panorama da distribuição de todas as coagulopatias hereditárias no Brasil, baseando-se nas informações encaminhadas pelos Estados, ainda que incompletas. Esse estudo apontou a existência de 8.168 pacientes cadastrados, dos quais 6.885 eram portadores de Hemofilia A e 1.283 portadores de Hemofilia B (MANSO et al., 2007). A atualização desses números, no ano de 2009, mostra que o número de pacientes com hemofilia A no Brasil subiu para 8427 e representa 56,6% dos pacientes com coagulopatias e transtornos hemorrágicos. O tratamento disponível para esses pacientes é basicamente sob demanda e realizado com o FVIII_{dp} do plasma fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2010a).

A expectativa de vida para pacientes hemofílicos A tratados com preparados livres de contaminação viral é aproximadamente 10 anos menos que a média populacional. Sem tratamento, muitos dos pacientes morrem nas duas primeiras décadas de vida (ANTUNES, 2002; WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2006).

Sendo assim, a experimentação animal possui um grande impacto no estudo e compreensão da hemofilia, bem como na elaboração de novas estratégias terapêuticas baseadas em terapias inovadoras como a terapia gênica e celular.

A terapia celular para hemofilia é uma modalidade mais segura quando comparada à terapia gênica com vetores virais ou não virais (BHOPALE; NANDA, 2003) e alguns trabalhos já demonstraram a eficiência de células endoteliais sinusoidais hepáticas (KUMARAN et al., 2005) e células endoteliais produtoras de FVIII originadas de células pluripotentes induzidas (iPS) (XU et al., 2009).

Outros estudos utilizando modelos animais já demonstraram que transplante de células-tronco fetais podem ter sucesso no tratamento de muitas doenças crônicas, como Parkinson, diabetes, doenças da medula espinal, degeneração das células de Purkinje, distrofia

muscular de Duchenne, falência de fígado, coração e imperfeições osteogênicas (HORWITZ, 1999; KOBAYASHI et al., 2000).

Considerando esta importância da experimentação animal na busca de um tratamento para a hemofilia, propomos a utilização de um modelo adaptado daquele descrito por Heiniger (1988), o qual utilizou ovelhas fêmeas da raça White Alpine. Considerando esta importância, acreditamos que o uso de células precursoras como os hemangioblastos e a experimentação animal possam ajudar na elaboração de possíveis formas de tratamento para a hemofilia.

Neste contexto, pelo fato do saco vitelino ser o local primário de formação das células sanguíneas e endoteliais nos estágios iniciais da embriogênese e até fetais em algumas espécies (MEDVINSKY et al., 2008; DZIERZAK; MEDVINSKY; 2008; WANG et al., 2008) e por essas células possuírem morfologia homogênea, serem primitivas e não expressarem em sua superfície marcadores de células maduras ou antígenos codificados pelo Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) associados à rejeição de enxertos de tecidos, estas células tornam-se uma importante fonte de células-tronco de grande impacto para a Terapia Celular (WILPSHAAR et al., 2002).

Contudo, para um estudo pormenorizado sobre a utilização e segurança dessas células-tronco de origem vitelínica em modelo ovino, há primeiramente a necessidade de caracterizar morfolologicamente e estruturalmente o saco vitelino desta espécie, assim como as células oriundas desta membrana embrionária, a fim de delinear os parâmetros que norteiam a utilização das células-tronco vitelínicas como terapia celular para hemofilia e muitas outras doenças humanas.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade de um futuro tratamento celular para hemofilia e a utilização alternativa de células-tronco de origem vitelina, faz-se necessário uma caracterização morfológica e ultraestrutural da membrana vitelina da espécie ovina, bem como das células derivadas deste órgão embrionário, proposta neste trabalho.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as células-tronco hematopoéticas e progenitoras endoteliais do saco vitelino de embriões ovinos, e descrever microscópica e ultraestruturalmente a membrana vitelina da espécie ovina em diferentes idades embrionárias.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar as células do saco vitelino nas diferentes idades embrionárias;
2. Identificar as células do saco vitelino em diferentes idades embrionárias;
3. Avaliar diferentes métodos de cultivo celular;
4. Avaliar a capacidade de formação de colônia;
5. Avaliar a capacidade de formação de vasos;
6. Caracterizar imunofenotipicamente as células hematopoéticas e endoteliais do saco vitelino, através de técnicas de PCR em tempo real e citometria de fluxo;
7. Analisar microscopicamente a membrana vitelina;
8. Analisar ultraestruturalmente a membrana vitelina por microscopias eletrônicas de transmissão e varredura.

4 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão busca descrever conceitos e parâmetros relativos ao surgimento de uma célula precursora comum tanto para a linhagem endotelial como para a hematopoética em sítios mais primitivos de desenvolvimento sanguíneo como o saco vitelino. Para isto, esta revisão aborda tópicos relacionados à morfologia, formação e origem do saco vitelino; à hematopoese ainda altamente discutida quanto ao seu início e origem; e ao surgimento do hemangioblasto também foco de estudos para melhores esclarecimentos quanto ao seu real local de origem, surgimento e aparecimento, além de uma descrição das células-tronco hematopoéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco do saco vitelino.

4.1 MORFOLOGIA DO SACO VITELINO

Esta seção abordará a formação embriológica do saco vitelino e terá continuidade com aspectos morfofuncionais peculiares a membrana vitelina

4.1.1 Formação embriológica do saco vitelino

No início da embriogênese, na fase de blastocisto, o trofoblasto pode diferenciar-se em uma camada mais interna, proliferativa, chamada de citotrofoblasto e, em uma camada celular mais externa, chamada de sinciotrofoblasto, a qual é responsável pela erosão dos tecidos maternos (SADLER, 2005).

A massa celular interna, outro constituinte do blastocisto, depois chamada embrioblasto, enquanto isso se diferencia em epiblasto e em hipoblasto, e juntos formam um disco bilaminar. As células epiblasticas darão origem aos amnioblastos, os quais revestem a cavidade amniótica em um sentido superior à camada epiblastica. As células do hipoblasto,

por sua vez, apresentam-se distribuídas de forma contínua com a membrana exocelômica e é nesse momento específico que a formação do saco vitelino se inicia, mais precisamente quando o hipoblasto (endoderma prospectivo) sofre deslocamento e delamina-se dando origem à cavidade de blástula (MOSSMAN, 1987), circundando o saco vitelino primitivo (SADLER, 2005).

Por outro lado, o mesoderma formado no botão embrionário primitivo migra entre o epiblasto e o hipoblasto. Isto transforma a blástula em uma estrutura de três camadas. O epiblasto é então transformado no trofoblasto do córion. A cavidade forrada pelo endoderma é o saco vitelino. Este último, completa seu desenvolvimento no momento em que a porção extra-embrionária de celoma se alarga. Assim, o saco vitelino é uma esplancnopleura, a qual inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica. Constituído basicamente por células originadas a partir do disco embrionário, o saco vitelino pode formar em sua fase inicial uma camada fina de ectoderma chamada de saco vitelino uni laminar ou onfalopleura (MOSSMAN, 1987).

O hipoblasto produz células adicionais, que migram ao longo da parte interna da membrana exocelômica. Estas células proliferam e formam gradualmente uma nova cavidade dentro da cavidade exocelômica. Esta nova cavidade é denominada saco vitelino secundário ou saco vitelino definitivo. O mesoderma extra-embrionário primitivo que reveste o epiblasto e o âmnio é o mesoderma somatopleural extra-embrionário primitivo e o revestimento que circunda o saco vitelino é o mesoderma esplancnopleural extra-embrionário primitivo (SADLER, 2005).

Subseqüente à migração de células das camadas internas do endoderma para o ectoderma – momento o qual o saco vitelino bilaminar foi formado – o crescimento do mesoderma entre o endoderma e ectoderma darão origem ao saco vitelino trilaminar, presente em apenas algumas espécies (MOSSMAN, 1987).

Em répteis e mamíferos a expansão inicial do mesoderma converte para a forma trilaminar apenas a porção superior do saco vitelino bilaminar. Esta corresponde à base para o desenvolvimento de outras membranas típicas de amniotas como córion, âmnion, e alantóide (MOSSMAN, 1987).

Durante o desenvolvimento dos vertebrados, o processo morfogenético de gastrulação estabelece os três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) no embrião. A gastrulação inicia-se pela formação da linha primitiva na superfície do epiblasto. A extremidade cefálica da linha, o nó primitivo (nó de Hansen), consiste em uma área

discretamente elevada circundando a fosseta primitiva. As células do epiblasto migram em direção à linha primitiva, obtendo a forma de um frasco ao chegar à região da linha, onde se desprendem do epiblasto e passam sob o mesmo (GRAPIN-BOTTON, 2005; SADLER, 2005).

Uma vez invaginadas, algumas dessas células deslocam o hipoblasto (endoblasto), contribuindo para sua diferenciação em endoderma, enquanto outras se situam entre o epiblasto e o recém-originado endoderma, formando o mesoderma. As células remanescentes no epiblasto formam então por diferenciação, o ectoderma. Por meio da gastrulação, portanto, deduz-se que o epiblasto é responsável pela origem de todos os folhetos germinativos e que as células destes folhetos darão origem a todos os tecidos e órgãos no embrião (SADLER, 2005; MOSSMAN, 1987).

As células epiblasticas que passam pelo nó e pela linha são predeterminadas, por sua posição, para se tornar tipos específicos de mesoderma e ectoderma respectivamente. Após ficarem estabelecidos na região cefálica os três folhetos germinativos básicos – ectoderma, mesoderma e endoderma – o processo continua de modo a produzir estes mesmos folhetos germinativos em áreas mais caudais do embrião. Desta forma, tem início a diferenciação de tecidos e órgãos numa direção mais cefalocaudal enquanto a gastrulação continua (SADLER, 2005).

Com o aparecimento e a coalescência das cavidades intercelulares no mesoderma lateral, este tecido é dividido em duas camadas: uma camada contínua ao mesoderma que reveste o âmnio, chamada camada mesodérmica somática ou parietal e uma outra camada, contínua ao mesoderma que recobre o saco vitelino, denominada de camada mesodérmica esplâncnica ou visceral (SADLER, 2005).

Esta estrutura, o saco vitelino, que apresenta uma variedade de formatos e relações de sintopia com as demais membranas embrionárias e fetais, possui definida uma função primitiva de formar células-tronco pluripotentes (CTP), segundo Beiguelman (2000) e Cho et al. (2006), capazes de formar as células sanguíneas, bem como o tecido das veias, artérias e capilares, além das funções de síntese e de absorção.

4.1.2 Características morfológicas do saco vitelino

A maioria das espécies apresenta particularidades específicas durante o desenvolvimento embrionário, porém todas apresentam uma sequência básica que consiste de segmentações ou clivagens, gastrulação, neurulação e organogênese (NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

Os anexos embrionários por sua vez, estão presentes durante o desenvolvimento dos vertebrados, sendo mais desenvolvidos dentre os vivíparos. O saco vitelino é um destes anexos, o qual, interessante, é o único presente em todas as espécies (MOSSMAN, 1987).

Apesar da importância do saco vitelino, Mossman (1987) afirmou há algumas décadas que a sua estrutura, seu grau de diferenciação, tempo de aparecimento e desaparecimento e a grande variação entre as espécies eram questões pobremente descritas na literatura.

Palis e Yoder (2001) relataram que o saco vitelino acompanha a parede do exoceloma e o mesoderma extra-embrionário, estando delimitado por uma camada unicelular endodérmica.

Latshaw (1987) e Baron (2003) relataram que o saco vitelino de mamíferos domésticos é inicialmente grande, mas regride quando a placenta permanente se desenvolve (LATSHAW, 1987).

Godkin et al. (1988) afirmaram que o desenvolvimento do saco vitelino em bovinos alcança seu desenvolvimento ao redor do 20º dia de gestação sofrendo regressão rapidamente (MOSSMAN, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990). Já Wrobel e Suess (1998) relataram que o mesmo se desenvolve com 18 a 23 dias de gestação, entrando em um processo de involução e se degenerando em um curto período de tempo. Barone (1976) descreveu que o saco vitelino em algumas espécies se desenvolve a partir da 20ª semana e Bryden et al. (1972) relataram esse desenvolvimento ocorrendo no 25º dia de gestação, sendo que seus vestígios até o final da gestação não são mais encontrados (LATSHAW, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990; WOODING E FLINT, 1994). Ainda em relação à permanência do saco vitelino, segundo Barone (1976), o saco vitelino involui e se degenera muito cedo nos ruminantes, os quais apresentam esta involução a partir da segunda semana e até o final da prenhez seus vestígios desaparecem.

Em ruminantes o saco vitelino é grande e vascular e completamente cercado pela cavidade extra-embriônica. Em bovinos o saco vitelino se solta do cório pelo vigésimo dia de

gestação e no vigésimo quinto dia o saco vitelino se reduz a uma estrutura sólida na forma de um cordão (LATSHAW, 1987). Nos embriões ovinos com 42mm de Crown Rump (CR) ocorre também a degeneração das paredes do saco vitelino (RUSSE et al., 1992).

Em mamíferos domésticos, assim como no homem, o saco vitelino é transitório. Em humanos, aproximadamente duas a três semanas após a fertilização e a implantação do ovo no endométrio, surge no mesênquima lateral à notocorda agrupamentos de células, denominados “ilhas sanguíneas”, que representam os progenitores do sistema vascular e hematopoético. As células mais externas das ilhas formarão o endotélio e as mais centrais (hemocitoblasto) se tornam livres no lúmen (ZAGO; COVAS, 2006).

Segundo Russe et al. (1992), durante o desenvolvimento do saco vitelino de embriões bovinos e ovinos, mudanças de forma e estrutura da endoderme podem ocorrer. No início, as células que revestiam o blastocisto eram consideradas chatas e possuíam apenas poucas organelas celulares, mas tornaram-se prismáticas em embriões com 3mm de CR. Na análise microscópica de luz, observaram o citoplasma tonalizado de escuro com grande quantidade de vesículas e microvilosidades. No embrião implantado, com tamanho de 4-5mm, a endoderme do saco vitelino era simples sendo formada por células prismáticas e células primárias grandes de 15-20 μ m de altura, com coloração escura. Ao mesmo tempo apareceram ao lado das células escuras, células arredondadas claras no epitélio em embriões ovinos com 5,5mm de CR (18º dia de gravidez). Em embriões de 9mm de CR as células claras, com 20 μ m de comprimento eram repletas de vesículas. O epitélio tornou-se em parte estratificado. Na parede do saco vitelino de um embrião com 11mm de CR encontraram-se dispostas células endodérmicas claras e escuras alternadas uma ao lado da outra ou formando grupos de células homogêneas.

Sob microscopia eletrônica de transmissão foram observadas numerosas células escuras e claras. Nas células escuras de ovinos e bovinos foram observados retículos endoplasmáticos granulares ordenados paralelamente. As células claras apresentaram-se grandes, cheias de cisternas com material flocoso do retículo endoplasmático dominante, e em algumas regiões com ribossomos. As mitocôndrias ovóides apresentaram cristas e uma matriz relativamente clara. Complexos de Golgi foram notados, entretanto não eram predominantes. As células claras possuíam um núcleo com vesículas rico em eucromatina contendo nucléolos. O núcleo poligonal das células escuras era rico em heterocromatina. Para embriões de 12mm de CR, a infiltração da endoderme do saco vitelino entre os capilares densos preenchidos com eritroblastos primitivos era muito intensa. Com 36mm de CR, o saco vitelino constituía-se de

aglomerados celulares que eram formados por células claras e escuras, ou de ambos os tipos (RUSSE et al., 1992).

De acordo com Tiedmann (1979) a ultraestrutura da superfície do endoderma do saco vitelino de gatos de 23 a 32 dias é muito semelhante. Sobre a margem superior dos moldes das células endodérmicas, estas possuem um arranjo circular. O endoderma era tipicamente pavimentoso no pólo apical das células, e a média de diâmetro era de 16 micra. Curtos e uniformemente distribuídos, os microvilos mostraram-se somente marginais e diferenciaram-se de célula para célula. Com 54 dias ou mais, as células eram menores e possuíam forma de cúpula. Nas bordas dos grossos sulcos posicionavam-se microvilos que se associavam com os sítios de barreiras terminais. Neste estágio, as células assemelhavam-se com as células do parênquima do fígado em muitos aspectos. Em relação ao mesotélio do saco vitelino, este também não mostrou alterações na microscopia eletrônica em todo o período gestacional. As células do mesotélio apresentavam longos microvilos (2,5µm) por todo o epitélio comparado neste trabalho. Muitas células mesoteliais possuíam somente a metade do diâmetro das células endodérmicas.

Segundo Assis Neto (2005) o saco vitelino em fases iniciais da gestação apresenta uma porção única que se bifurca próximo do ventre do embrião, formando duas extremidades longas e finas. Com o evoluir da gestação o comprimento total do saco vitelino vai diminuindo e as extremidades alongadas vão se tornando vestigiais e desaparecem.

Tiedemann (1979) afirmou em seus estudos que o endotélio dos vasos sanguíneos do saco vitelino de gatos são fenestrados e apresentam membrana basal completa. Estas condições são favoráveis para a passagem de proteínas e de células sanguíneas. A diapedese de plaquetas, reticulócitos e eritrócitos também foram relatados ocorrendo da mesma forma em humanos (LARSEN; KNOTH, 1971).

A fusão das ilhas sanguíneas eventualmente resulta na formação de um sistema de canais vasculares contínuos através do saco vitelino. Os vasos vitelinos desenvolvem-se e conectam a vasculatura embrionária com a vasculatura vitelina (RUGH, 1968). O maior vaso sanguíneo embrionário surge devido a um processo de vasculogênese pelo desenvolvimento *in situ* de células endoteliais a partir de angioblastos (RISAU et al., 1988). Estudos realizados em quimeras de aves sugeriram que esta vasculogênese está principalmente relacionada à formação do coração, da aorta dorsal, dos vasos cardinal e vitelino bem como dos vasos extra embrionários do saco vitelino (PARDANAUD et al., 1987). A formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes é conhecida como angiogênese e é responsável pela

formação das artérias intersomáticas e os vasos que suprem os órgãos. Não é compreendido, no entanto, como as células precursoras endoteliais reúnem-se para formar os canais vasculares e qual a sinalização que direciona a organização espacial dos vasos sanguíneos no embrião (YAMAGUCHI et al., 1993).

Na maior parte dos embriões vertebrados, répteis, aves e mamíferos, os quais tem membranas extra-embrionárias um ramo da aorta dorsal alcança estruturas adjacentes como o saco vitelino que está unido ao intestino médio e o alantóide sendo um divertículo do intestino posterior. Os primeiros vasos formam as artérias vitelinas e os segundos, as artérias alantóides ou umbilicais futuramente (NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

Ainda sobre a vasculogênese, Palis e Yoder (2001); Choi (2002); McGrath e Palis (2005) e Sadler (2005) descreveram que os vasos se originam das ilhotas sanguíneas, no mesoderma do saco vitelino e depois no mesoderma lateral e em outras regiões. Estas ilhotas se originam de células mesodérmicas que induzidas por FGF-2 (Fibroblast Growth Factor - 2) formam os hemangioblastos, um precursor comum da formação de vasos sanguíneos e células sanguíneas (CHOI, 2002; SADLER, 2005).

De acordo com Russe et al. (1992) alguns dos vasos sanguíneos vitelinos internos do embrião continuam a ser mantidos como principais vasos sanguíneos viscerais no adulto.

Palis e Yoder (2001) relataram que embora existam diferenças entre as espécies, o aparecimento da célula progenitora hematopoética no saco vitelino é semelhante em murinos e no homem.

No entanto, apesar da importância do saco vitelino como órgão placentário e hematopoético serem bem conhecidos nos roedores (SLADE, 1970; KING E ENDERS, 1970; HAAR; ACKERMAN, 1971), a literatura ainda é escassa em animais domésticos.

Nos ruminantes o saco vitelino é funcional durante um curto período de tempo (NODEN; DE LAHUNTA, 1990), porém, suas funções nesta fase são muito importantes, destacando-se a absorção e digestão de nutrientes maternos, a síntese de proteínas, a formação da circulação vitelina e a secreção intravascular de nutrientes (LATSHAW, 1987; BARON, 2003).

Além da função hematopoética, o saco vitelino também pode executar algumas funções do fígado (antes da maturação do fígado fetal), sintetizando proteínas em comum com o fígado fetal (GULBIS et al., 1998; GALDOS-RIVEROS, 2010).

Thomas et al. (1990) afirmou ainda que a interface entre os tecidos materno e fetal do saco vitelino visceral contribui para manter o conteúdo protéico do compartimento fetal, pois

estas proteínas são capazes de entrar na circulação fetal, embora não se saiba ainda o exato local de ação desta secreção.

No entanto, os processos de vasculogênese e hematopoese do saco vitelino são interdependentes do ponto de vista do desenvolvimento embrionário. Além disso, as células primitivas que formam os vasos sanguíneos (angioblastos) são responsáveis também pela formação das células sanguíneas circulantes, através de uma célula precursora comum. A linfopoese, a mielopoese, a expansão das CTH primitivas, assim como a hemoglobina embrionária realizada pelas CTH são eventos regulados pelo endotélio vitelino (AUERBACH et al., 1996).

A descrição morfológica do saco vitelino principalmente em um contexto funcional primitivo de hematopoese torna necessário o entendimento e a caracterização desta célula, presente no saco vitelino, descrita como precursora de ambas linhagens celulares hematopoéticas e endoteliais, denominado hemangioblasto.

4.2 O HEMANGIOBLASTO

A formação das células sanguíneas está intimamente relacionada com o desenvolvimento das células endoteliais no saco vitelino. Isso conduz a hipótese que ambos tipos celulares originam-se de um precursor comum: o hemangioblasto (SABIN, 1920; MURRAY, 1932; WAGNER, 1980[†] apud CHOI et al., 1998; LI; WEI; WAGNER, 1999; JAFFREDO et al., 2005).

O saco vitelino de embriões mamíferos contém hemangioblastos. Estes são células precursoras hábeis para diferenciar-se em linhagens hematopoéticas e endoteliais através de processos de hematopoese e vasculogênese (LI; WEI; WAGNER, 1999).

O conceito do hemangioblasto surgiu inicialmente pela identificação de um tipo celular formador de colônia blástica (BL-CFC) durante uma diferenciação de células-tronco embrionárias a partir de um precursor clonal, o qual deu origem à colônias blásticas com ambos componentes endotelial e hematopoético (KABRUN et al., 1997).

[†] WAGNER, R. C. Endothelial cell embryology and growth. **Advances in Microcirculation**, v. 9, p. 45-75, 1980.

Inicialmente, os hemangioblastos surgem no saco vitelino e ficam localizados no centro das ilhotas sanguíneas. Os hemangioblastos centrais formam as primeiras células-tronco hemocitopoéticas, enquanto os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores dos vasos sanguíneos. Estes angioblastos proliferam e são finalmente induzidos a formar células endoteliais pelo fator de crescimento vascular (VEGF - Vascular Endotelial Growth Factor) secretado por células mesodérmicas circulantes (SADLER, 2005).

A origem do hemangioblasto foi previamente descrita em murinos, no momento em que as primeiras células tronco hematopoéticas e vasculares desenvolveram-se da mesoderma extra-embrionária do saco vitelino aos 7.5 dias de gestação (YOKOMIZO et al., 2007). Uma vez formadas, essas progenitoras iniciais organizavam-se em ilhas sanguíneas, as quais consistiam de eritroblastos primitivos circundados por uma camada de células endoteliais (TAM; LOEBEL, 2007). Essa íntima associação de desenvolvimento das linhagens hematopoéticas e endoteliais dentro das ilhas sanguíneas confirmaram a hipótese de que ambas são originadas deste precursor comum denominado hemangioblasto (WAGNER, 1980; CHOI et al., 1998).

O conceito do hemangioblasto ganhou mais sustentação a partir da observação de que as células das linhagens endoteliais e hematopoéticas compartilhavam a expressão de um número de diferentes genes (FINA et al., 1990; MILLAUER et al., 1993; YAMAGUCHI et al., 1993; ANAGNOSTOU et al., 1994; KALLIANPUR et al., 1994; YOUNG et al., 1995; ASAHARA et al., 1997; KABRUN et al., 1997). Dentre estes, o FLK-1, um receptor do VEGF é um gene requerido para o desenvolvimento das ilhas sanguíneas (MANDRIOTA; MENOUD; PEPPER, 1996), sendo considerada desta forma, uma evidência clara de que essas linhagens possam originar-se de um precursor comum.

Lugus, Park e Choi (2005) relataram que a expressão do Flk-1 contribui para o sistema circulatório, incluindo hematopoese, endotélio, músculo esquelético e músculo cardíaco, e, além disso, sugeriram que a expressão de tal gene pelo hemangioblasto é regulada pelo gene SCL. Kabrun et al. (1997) descreveram que a expressão do receptor Flk-1 pode representar um marcador ideal para o isolamento do hemangioblasto (YOSHIMOTO; YODER, 2009). Kabrun et al. (1997) confirmaram esta hipótese e demonstraram que o hemangioblasto pode ser isolado de células tronco embrionárias diferenciadas em cultura baseado na expressão de Flk-1. Os autores ainda comprovaram que essas células são capazes

de gerar colônias blásticas contendo células hematopoéticas e endoteliais após 4 dias em cultura.

Atualmente, outra teoria propõe que o hemangioblasto pode gerar células hematopoéticas através de um estágio de endotélio hemogênico. Trata-se de uma teoria conflitante, onde as primeiras células hematopoéticas podem se originar de uma célula endotelial diferenciada fenotipicamente, denominada de endotélio hemogênico (LANCRIN et al., 2009), porém pouco ainda é conhecido sobre este fenômeno.

Bollerot, Pouget e Jaffredo (2005) descreveram que o gene VEGFR-2 interfere na formação de colônias de células hematopoéticas, que o hemangioblasto expressa os genes SCL, Tal-1 e Lmo-2, e que os genes Runx-1, CBF β , GATA-3 e CD45 são específicos de células hematopoéticas. Os autores destacaram ainda que o hemangioblasto expressa o gene Runx-1 também em sítios intra-aórticos e endotélio hemogênico, em um tipo secundário de diferenciação.

Além das teorias citadas em relação à existência do hemangioblasto e formação de células sanguíneas através de células endoteliais hemogênicas, Bollerot, Pouget e Jaffredo (2005) descreveram estudos que afirmaram que as CTH originam-se de novo de células mesenquimais.

Basak et al. (2009) em estudos de mapeamento revelaram que o hemangioblasto no embrião existe em maiores números na região posterior da linha primitiva. Essa observação suporta a noção de que o cometimento hematopoético é iniciado anteriormente à formação do saco vitelino e ilhas sanguíneas.

Eilken, Nishikawa e Schroeder (2009) mostraram recentemente através de tecnologia de imagens, que células mesodermas de embriões de camundongos foram capazes de originar colônias endoteliais hemogênicas. Tais células apresentavam morfologia endotelial no dia 6.5 e 7.75 de cultivo, e delas surgiram, neste mesmo período, células não aderentes com morfologia hematopoética.

No entanto, Yoshimoto e Yoder (2009) afirmaram recentemente que a relação entre endotélio hemogênico e hemangioblastos nunca foi resolvida e Choi et al. (1998) relataram ainda, que apesar de essas observações serem consistentes com o conceito do hemangioblasto, os mecanismos que controlam sua relação com a hematopoese e a vasculogênese embrionária ainda não são compreendidos (BARON, 2003), nem tampouco provam sua existência (CHOI et al., 1998).

Apesar das teorias dispares existentes em relação a este tipo celular capaz de originar duas linhagens celulares distintas, é possível compreender claras evidências com a formação embriológica de que para o desenvolvimento embrionário normal ocorrer é necessário que uma gama de fatores gênicos e hematopoéticos sinalize e atue em conjunta ação, no sentido de fornecer e manter uma produção de CTH ativa e de suporte para as mais variadas e específicas necessidades do conceito que está sendo formado.

4.3 HEMATOPOESE

A hematopoese constitui-se de um sistema complexo em que células-tronco autorenováveis e indiferenciadas, dão origem a células mais comprometidas que adquirem um fenótipo restrito, e que progressivamente resulta na amplificação e diferenciação de várias linhagens maduras do sangue (FENNIE et al., 1995; JAFFREDO et al., 2005).

No início do desenvolvimento embrionário, um tecido hematógeno é formado na esplancopleura extra-embrionária do saco vitelino. Este tecido é representado, inicialmente, por ninhos de células mesenquimais chamadas hemangioblastos, que em conjunto recebem o nome de ilhotas de Wolff. Os hemangioblastos centrais de cada ilhota de Wolff darão origem aos hemocitoblastos, responsáveis pela formação de todas as células do sangue e do sistema imune, sendo também chamadas de células-tronco, fundamentando a teoria monofilética da origem do sangue. Uma percentagem da população de hemocitoblastos diferencia-se em eritroblastos muito grandes (megablastos), que entram no embrião através dos vasos também em formação (GEORGE et al., 1998; GASPER, 2000). Essas células sanguíneas têm vida curta e são constantemente renovadas pela proliferação mitótica de células localizadas nos órgãos hemocitopoéticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Pereda e Niimi (2008) descreveram que em humanos, a geração inicial de células sanguíneas ocorre no saco vitelino extra-embrionário durante a terceira semana pós-concepção. Por isso, o saco vitelino é considerado a fonte primária de células progenitoras hematopoéticas, que circulam através do sistema sanguíneo do embrião e transferem as primeiras células sanguíneas. No entanto, Fennie et al. (1995) sugeriram que o desenvolvimento hematopoético mais inicial pode ocorrer também na região aorta-gonado-mesonefros (AGM) intraembriônica, porém tal comprovação foi apenas inferida.

Neste sentido, Jaffredo et al. (2005) relataram que aves e anfíbios nas regiões da esplancnopleura paraórtica (PAS) e na AGM geram células-tronco e progenitoras hematopoéticas multipotentes.

O sistema hematopoético é estabelecido em locais específicos no embrião através de uma sucessão de eventos de desenvolvimento que resultam na geração de células precursoras formadoras de colônia distintas, as quais entram na circulação sanguínea. As primeiras células hematopoéticas no embrião do rato originam-se nas ilhas sanguíneas que se formam na mesoderma extraembriônica ao estágio da placa neural de desenvolvimento do embrião (PALIS et al., 1999).

O desenvolvimento hematopoético do saco vitelino ocorre na região luminal da ilhota sanguínea e é circundada pelas células endoteliais (YOUNG et al., 1995; GODIN; CUMANO, 2002). O surgimento do tecido sanguíneo está diretamente relacionado com o aparecimento evolutivo do terceiro folheto embrionário, denominado mesoderma. Godin e Cumano (2002) demonstraram que a deficiência de genes envolvidos na determinação mesodérmica afeta irreversivelmente o tecido hematopoético.

Além disso, o desenvolvimento inicial da atividade hematopoética no saco vitelino conduz a hipótese de que esse tecido é o local primário de desenvolvimento hematopoético e que as células-tronco derivadas dele semeiam os outros sítios intraembriônicos (MOORE; OWEN, 1967). Moore e Owen (1967) afirmaram também que os outros sítios hematopoéticos não atuam na produção de CTH, apenas são sujeitos à colonização secundária das células derivadas do saco vitelino.

No entanto, de acordo com Mikkola et al. (2005), as células hematopoéticas se desenvolvem no embrião em vários locais anatômicos. Atividades coordenadas de diferentes locais de hematopoese asseguram produção rápida de células sanguíneas diferenciadas para as necessidades imediatas do embrião, além de manter um pool de células hematopoéticas indiferenciadas.

Jaffredo et al. (2005) afirmaram que o saco vitelino produz um estoque de células hematopoéticas, onde parte dessas células se diferenciam *in situ*, ou seja, no próprio tecido, enquanto outras colonizam órgãos hematopoéticos. No entanto, a capacidade de diferenciação das células hematopoéticas provavelmente é influenciada pelo microambiente do saco vitelino, podendo originar células mielóides, eritróides e hematopoéticas.

Rohen e Drecool (2005) também descreveram que a hematopoese embrionária pode ocorrer em etapas, iniciando-se juntamente com o sistema vascular no mesênquima extra-

embrionário que é a eritropoese megaloblástica nas ilhotas sanguíneas do saco vitelino e no cório, a qual origina grandes megaloblastos nucleados. A outra etapa da hematopoese chamada de período hepatoesplênico, surge no fígado e a partir da 12ª semana no baço. Posteriormente o fígado e o baço funcionam como órgão hemocitopoético temporário, porém, no segundo mês de vida intra-uterina humana a clavícula começa a se ossificar e tem início a formação da medula óssea hematógena em seu interior. À medida que a ossificação avança no resto do corpo, a medula óssea se torna cada vez mais importante como órgão hemocitopoético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROHEN; DRECOOL, 2005; MIKKOLA et al., 2005).

Durante o desenvolvimento do camundongo, as primeiras células hematopoéticas, consistindo de precursoras com potencial mielóide e/ou eritróide aparecem no saco vitelino 7 dias pós coito (PALIS et al., 2001). Antes do estabelecimento da circulação (8 dias pós coito), as primeiras progenitoras dotadas de atividade de restituição a longo termo são geradas na esplancnopleura intraembrionária e estão ausentes no saco vitelino (CUMANO; DIETERLEN-LIEVRE; GODIN, 1996; CUMANO et al., 2001). No entanto, após a circulação ser estabelecida, precursores multipotentes com atividade de restituição a longo termo (MULLER et al., 1994; YODER et al., 1997), podem ser encontradas no sangue (DELASSUS; CUMANO, 1996) e no saco vitelino (GODIN; DIETERLEN-LIEVRE; CUMANO, 1995).

Na placenta, a atividade hematopoética, segundo Mikkola et al. (2005), inicia-se antes de que as CTH entrem na circulação e colonizem o fígado fetal. Além disso, a atividade hematopoética da placenta culmina em uma expansão rápida do aglomerado de CTH definitivas no momento em que o reservatório de CTH aumenta durante a evolução do crescimento fetal (BANKS, 1992; BARON, 2003; MIKKOLA et al., 2005; MCGRATH; PALIS, 2005). Os angioblastos, dispostos mais externamente, formam tubos endoteliais que revestem pequenas cavidades e assim se tornam os primeiros vasos de natureza capilar. Os hemangioblastos localizados mais internamente se transformam e atuam como fonte de células sanguíneas. A formação dos vasos sanguíneos e das células hematopoéticas na região das ilhotas sanguíneas é induzida pelo endoderma do saco vitelino e prossegue pelo cório adjacente, pelo trofoblasto e posteriormente para o corpo do animal (BARON, 2003; ROHEN; DRECOOL, 2005).

Interessantemente Godin, Dieterlen-Lièvre e Cumano (1995) evidenciaram o aparecimento simultâneo de células hematopoéticas nas regiões do saco vitelino e esplancnopleura paraaórtica no estágio de desenvolvimento embrionário de 10-25 somitos

(8.5-9.5 dias de gestação do embrião de camundongo). Esse achado representou uma nova origem para as CTH primitivas e contradisse a teoria de que as mesmas podem originar-se em um dos dois locais primariamente e migrar para outro. No entanto, os autores acreditam que surgem primeiramente algumas células hematopoéticas multipotentes no saco vitelino, as quais engajam-se na eritropoese enquanto uma segunda onda de células hematopoéticas que aparecem simultaneamente no saco vitelino e esplancnopleura paraaórtica são responsáveis pela hematopoese definitiva, as quais provavelmente migram e colonizam o fígado e o timo fetal, bem como o quanto independente ocorre um local do outro, anteriormente à migração da endoderme e da mesoderme para estes locais ventral e dorsal.

Posteriormente, Cumano et al. (2001) novamente isolaram explants do saco vitelino e da esplancnopleura paraaórtica antes do estabelecimento da circulação intraembrionária. Neste trabalho descreveram que os precursores derivados do local intraembrionário foram capazes de gerar uma progênie de células hematopoéticas de multilinhagens em ratos adultos com mais de 6 meses de idade.

No mesmo ano, esse mesmo grupo de pesquisadores afirmou que o saco vitelino é o primeiro local de produção de células sanguíneas no rato e no homem. As células eritrocíticas primitivas originaram-se no saco vitelino e completaram a maturação, incluindo enucleação, na circulação sangüínea. Os autores declararam que, embora diferenças entre as espécies existam, o aparecimento padrão de uma célula progenitora hematopoética no saco vitelino é semelhante, pois há uma fase de desenvolvimento na qual as células sangüíneas vermelhas são produzidas pelos progenitores eritrocíticos do saco de vitelino (PALIS; YODER, 2001).

Esses resultados comprovaram a existência de uma capacidade diferencial de hematopoese em tecidos vivos embrionários, indicando que as únicas células capazes de produzir hematopoese adulta a longo prazo são de origem intra-embriônica. McGrath e Palis (2005) cultivaram novamente células obtidas através de explants do saco vitelino para entender o processo de desenvolvimento das células sanguíneas e células endoteliais do mesoderma extra-embriônico. Os autores sugeriram então, que a presença do endoderma do saco vitelino ou sua matriz extracelular é necessária para a coalescência de células endoteliais no desenvolvimento de redes capilares.

Durante ontogenia dos vertebrados, os sítios hematopoéticos modificaram-se à medida que surgiram novas populações de células-tronco. No desenvolvimento dos mamíferos, as células-tronco hematopoéticas sequencialmente ocupam o saco vitelino, o fígado fetal e a medula óssea adulta (NARDI; ALFONSO, 2006). Diferentemente, Jaffredo et al. (2005)

afirmaram que as CTH são geradas primeiramente na região AGM nos 10.5 dias embrionários do camundongo e nas artérias vitelinas e umbilicais. Após 24 horas (E11.5) essas células poderiam ser também encontradas no saco vitelino, migrando posteriormente para o fígado fetal e medula óssea, onde se manterão por toda a vida do indivíduo. Dzierzak e Oostendorp (2001) descreveram estudos mostrando que nenhuma atividade hematopoética foi encontrada em embriões com ausência de saco vitelino (MOORE; METCALF, 1970), inferindo pois, a importância do saco vitelino no início e regulação da hematopoese.

Como descrito, a hematopoese tem por finalidade gerar, a partir de células-tronco mais primitivas, células maduras de diferentes linhagens sanguíneas, no intuito de originar e compor um tecido hematógeno capaz de suprir e conduzir a maioria das necessidades embrionárias celulares e fisiológicas nos diferentes estágios de desenvolvimento.

4.4 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Zago e Covas (2006) relataram que as células-tronco mais caracterizadas e mais utilizadas na medicina são as células hematopoéticas da medula óssea. Além da medula óssea, essas células são abundantes no sangue de cordão umbilical (SCU) e na placenta de recém nascidos, as quais também são consideradas células-tronco do adulto. Segundo os autores, o uso de células-tronco do SCU em transplantes é mais vantajoso do que o de medula óssea porque elas se implantam mais eficientemente, são mais tolerantes à incompatibilidade entre receptor e doador, têm disponibilidade imediata e há possibilidade de realização do transplante sem que o doador seja submetido a qualquer procedimento cirúrgico.

Em relação ao sistema hematopoético, as CTH são as únicas células que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema hematopoético continuamente até a morte (GASPER, 2000; HERZOG et al., 2003). Sua origem é mesenquimal e, durante o período de vida intra-uterino, estão presentes no saco vitelino embrionário e, posteriormente, deslocam-se por via hematógena para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal. Na metade do período de vida intra-uterino, a hematopoese passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoético no final da gestação até a vida adulta (JAIN, 1993).

A maioria das CTH encontra-se na fase de repouso do ciclo celular e com pouca atividade mitótica, multiplicando-se apenas o suficiente para manter sua população, que é reduzida (GASPER, 2000). Sua ativação, segundo Jain (1993), requer grande estímulo no tecido hematopoético, para que as CTH aumentem suas atividades mitóticas, produzindo grandes quantidades de células diferenciadas maduras. As células progenitoras, quando se dividem, podem originar outras células progenitoras e também precursoras, mas as precursoras só originam células sangüíneas maduras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A proliferação das CTH origina células filhas com potencialidade menor. Essas células filhas são as células progenitoras unipotentes ou bipotentes, que produzem as células precursoras (blastos). Ou seja, as células progenitoras unipotenciais desenvolvem-se em células precursoras reconhecíveis (rubrioblastos, mieloblastos, monoblastos e megacarioblastos), os quais finalmente aumentam o repertório de células maduras. As CTH e as progenitoras são indistinguíveis morfológicamente e se parecem com os linfócitos (JAIN, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), tendo alta razão núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos (GASPER, 2000).

Estudos iniciais em primatas e humanos estabeleceram que as CTH estão presentes no sangue periférico (SIENA et al., 1989; SCHOTS et al., 1996; ARMITAGE et al., 1997; ABONOUR et al., 1998; KESSINGER; SHARP, 1998; PÉREZ-SIMON et al., 1998), parênquima hepático embrionário (FORRESTER et al., 1991), medula óssea (KESSINGER; SHARP, 1998) e sangue do cordão umbilical (BROXMEYER et al., 1989; GLUCKMAN et al., 1989; BROXMEYER et al., 1992; LIN et al., 1999; PANEPUCCI et al., 2007).

Cumano e Godin (2001) relataram que existe controvérsia a respeito da contribuição do saco vitelino e precursores intra-embrionários para a hematopoese, pois seus resultados revelaram uma capacidade hematopoética diferencial de pré-circulação de tecidos embrionários in vivo e indicaram que somente células de origem intra-embrionária são capacitadas para hematopoese.

Francey et al. (1992) demonstraram que as células da medula óssea de ovinos são capazes de se diferenciar em fagócitos mononucleares e macrófagos. Kelly et al. (1986) destacaram que progenitores eritróides (unidades eritróides formadoras de colônias) podem ser isolados de sangue periférico de ovelhas e cultivadas sob condições definidas. Marsicano et al. (1997) descreveram ainda que a técnica de cultivo para cultura de medula ovina por longos períodos são capazes de sustentar células hemopoéticas.

Nardi e Alfonso (2006) relataram que as células-tronco hematopoéticas são raras, correspondendo a 0,05% do total de células da medula óssea e sangue de cordão umbilical, e bem menos no sangue periférico, apresentando baixa taxa de proliferação. Quanto ao seu fenótipo de superfície, a presença do antígeno CD34 é o principal marcador dessa população. Aproximadamente de 1% a 3% das células mononucleares da medula óssea expressam essa proteína, cuja função parece estar relacionada aos processos de localização e adesão das células-tronco e progenitoras, bem como à manutenção do fenótipo precursor.

McKinney-Freeman et al. (2009) compararam marcadores de superfície de CTH derivadas do saco vitelino murino, AGM, placenta, fígado fetal e medula óssea com aquelas derivadas de células tronco embrionárias diferenciadas in vitro. Os autores relataram que, apesar do c-Kit marcar todas as populações, as CTH mais primitivas expressaram CD41 e CD34 e perderam a expressão do CD45 e CD150. Por outro lado, as CTH mais maduras apresentaram expressão do CD45 e CD150 e perderam a expressão do CD41 e do CD34. Além disso, apesar da expressão do CD48 estar ausente em todas as amostras das CTH examinadas in vivo, as CTH diferenciadas das células tronco embrionárias apresentaram homogeneidade de expressão desta molécula, sugerindo um perfil mais primitivo desta população celular.

Além do CD34, outros marcadores de superfície e certos corantes têm sido utilizados para a caracterização do fenótipo da CTH, que atualmente pode ser definida como CD34⁺, CD38⁻, CD33⁻, Thy-1^{low}, CD71⁻, CD45RA^{low}, Lin⁻ (ausência de marcadores linhagem-específicas), Rh123^{low} (corante fluorescente rodamina 123), Ho33342^{low} (corante de ácido nucléico). Recentemente outro marcador descrito que pode estar associado com uma CTH mais progenitora é o CD133, que representa o homólogo humano das glicoproteínas transmembrana prominina 5 (PROML 1) de camundongos (NARDI; ALFONSO, 2006).

Embora a expressão do CD34 ser comumente associada às células-tronco, a diferenciação de células CD34⁺ a partir de células CD34⁻ já foi demonstrada por Zanjani et al. (1998) em quimeras de humano/ovelha, indicando novamente a complexidade deste sistema.

Ainda em relação aos marcadores, Kirchstein e Skirboll (2001) demonstraram que o fenótipo mais indicado para as CTH incluem o CD34⁺, CD38⁻, c-Kit⁺, Hoechst-dye⁺, Lin⁻, Sca-1⁺ e Thy-1⁺, e Weilbaeher (1991) descreveu os marcadores Thy-1⁺, Lin⁻ e Sca-1⁺ como os mais indicados para caracterizar as CTH da medula óssea.

Recentemente, Tárnok, Ulrich e Bocsi (2010) descreveram particularidades dos marcadores de superfície de diversos tipos celulares para as espécies humana e murina. Em

relação aos marcadores de CTH, o CD34 no fígado humano é positivo e na medula óssea murina é positivo/negativo, o CD45 é positivo para ambos, o c-Kit (CD117) é positivo apenas para medula óssea murina e o CD133 é positivo apenas para CTH hepáticas humanas. Dos marcadores de células progenitoras endoteliais (CPE), relataram positividade do CD31 para fígado e tecido adiposo humano, o CD144 (Ve-Cadherin) foi descrito como positivo para sangue periférico e tecido adiposo humano e o VEGFR-2 (KDR, Flk-1) foi relatado ser positivo para sangue periférico, tecido adiposo e fígado humano.

Ng et al. (2004) descreveram que o perfil de expressão de células CD34⁺ de vários sítios de hematopoese (medula óssea, sangue de cordão umbilical e sangue periférico) revelaram diferenças funcionais na atividade da célula tronco.

Atualmente, surgiram evidências de que as CTH seriam capazes também, em determinadas circunstâncias, de diferenciar-se em outras linhagens celulares não hematopoéticas. Fennie et al. (1995) comprovaram que além de o CD34 ser um bom marcador para CPE e CTH, as células endoteliais CD34⁺ do saco vitelino murino induziram a diferenciação de células hematopoéticas CD34⁺ do saco vitelino. Em vista deste potencial de diferenciação em outros tipos celulares, vários protocolos clínicos estão em andamento para comprovar a real utilidade terapêutica do uso destas células para o tratamento de diversas doenças (BITTENCOURT; ROCHA, 2006).

4.5 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS

Com o conceito de o hemangioblasto estar presente no saco vitelino, supõe-se que o desenvolvimento hematopoético e endotelial do embrião ocorra inicialmente neste órgão extra-embrionário.

Durante a embriogênese, é conhecida a ocorrência de dois fenômenos relacionados à formação dos vasos sanguíneos: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é a diferenciação in situ de células progenitoras endoteliais primitivas, conhecidas como angioblastos, em células endoteliais, as quais se agregam em um plexo vascular primário. Tal estrutura é responsável pelo desenvolvimento vascular durante a embriogênese (REYES et al., 2002). Ao contrário, a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a

partir de vasos já existentes durante o desenvolvimento embrionário ou na vida pós natal (WATT, 1995; PEICHEV et al., 2000; REYES et al., 2001).

A vasculogênese inicia-se com a formação de um cluster, ou ilha sanguínea, a qual compreende os angioblastos na periferia e as CTH no interior (ASAHARA et al., 1997).

Deb e Patterson (2010) relataram que a descoberta feita por Asahara et al. (1997) gerou uma nova era na biologia vascular. O achado deste grupo foi que células progenitoras endoteliais (CPE) isoladas de sangue periférico humano após seleção magnética por citometria de fluxo diferenciaram-se em células endoteliais *in vitro*. Estas células quando transplantadas em modelos animais de isquemia incorporaram em sítios de angiogênese ativa. Tal fato sugeriu que as CPE podem ser usadas para aumentar o crescimento vascular colateral em tecidos isquêmicos e podem conduzir agentes anti ou pro angiogênicos para sítios patológicos ou com angiogênese inativa. Apesar desta grande descoberta e da extraordinária produtividade científica dos últimos anos, Deb e Patterson (2010) afirmaram que a vasculogênese terapêutica com CPE está ainda apenas em sua “infância”.

Uma particularidade das células endoteliais é a produção e síntese de produtos e fatores relacionados a eventos homeostáticos e hemodinâmicos. Um exemplo disso são as células endoteliais sinusoidais hepáticas e as células de Kupffer, as quais produzem FVIII, um cofator não enzimático da cascata de coagulação, o qual sua síntese ocorre de maneira geral no fígado (KUMARAN et al., 2005). No entanto, o tipo celular específico produtor de FVIII ainda permanece controverso.

Foi realizado um estudo por Kumaran et al. (2005) utilizando células endoteliais sinusoidais hepáticas (CESH) e células endoteliais da linhagem celular MSI derivadas das ilhotas pancreáticas, com o intuito de demonstrar qual tipo celular seria responsável pela produção e estoque de FVIII, e com isso, uma opção viável de terapia celular para hemofilia A. Este estudo mostrou que as células endoteliais hepáticas podem produzir e secretar FVIII *in vivo* e que CESH reduziram o sangramento e corrigiram o fenótipo da hemofilia A de camundongos hemofílicos, sugerindo que células endoteliais poderiam ser alvos apropriados para terapia gênica e celular de FVIII (KUMARAN et al., 2005).

Kumaran et al. (2005) relataram que fisiologicamente as CESH oferecem vantagem para expressão de FVIII, inclusive pela presença de mecanismos intracelulares que facilitam a síntese, maturação e liberação de FVIII. No entanto, apesar de ser o órgão mais provável de produção de FVIII, o fígado claramente não é o único recurso de produção de FVIII, pois células endoteliais derivadas de outros locais podem produzir FVIII (WION et al., 1985;

HOLLESTELLE et al., 2001; LIN et al., 2002). Dentre eles destacam-se estudos que mostraram células endoteliais isoladas do pulmão que foram encontradas enxertadas em tecidos pulmonares pós transplante (EWING et al., 2003), células endoteliais circulantes que enxertaram-se em vasos doentes (GRIESE et al., 2003), além de células-tronco hematopoéticas derivadas de células sanguíneas mononucleares que podem produzir FVIII (LIN et al., 2002), podendo oferecer alvo terapêutico para hemofilia A.

4.6 CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO

É sugerido que o saco vitelino por ser o local primário de formação das células sanguíneas e endoteliais nos estágios iniciais da embriogênese e até fetais em algumas espécies possui células-tronco pluripotentes capazes de gerar células das linhagens hematopoética e endotelial. De fato, elas podem ser isoladas do saco vitelino antes da formação das ilhas sanguíneas, no estágio do desenvolvimento do embrião correspondente a sete dias para camundongos e dez para humanos (MEDVINSKY et al., 2008; DZIERZA; MEDVINSKY; 2008, WANG et al., 2008).

No período embrionário de oito dias em camundongos, as células mesodérmicas de dentro do saco vitelino começam a formar as ilhas sanguíneas. As células externas das ilhas se diferenciam em endotélio dando o início da formação dos vasos. As células situadas no centro das ilhas se tornam as primeiras células mesenquimais e os primeiros glóbulos vermelhos e brancos. As ilhas sanguíneas estabelecem comunicações para formar uma rede circulatória hematopoética, a qual se estabelece no embrião propriamente dito (MOORE; METCALF, 1970).

Ikuta et al. (1992), Palis e Yoder, (2001) e Zhang et al. (2003) relataram que apesar de não serem mais totipotentes, e estarem em uma linha de desenvolvimento mais determinada, as células do saco vitelino conservam a capacidade de proliferação rápida e pluripotência.

Li, Wei e Wagner (1999) testaram a capacidade de diferenciação de células vitelínicas em células endoteliais tubulares em modelos murinos, e concluíram que sobre o matrigel as células YS4 aderiram rapidamente e formaram uma camada completa de estruturas com formato de capilares no período de 12 horas.

A compreensão detalhada do processo de hematopoese vitelina possibilitaria o desenvolvimento de terapias para doenças como imunodeficiências, anomalias genéticas e anemias a partir da identificação dos tipos celulares afetados e de seu estágio de desenvolvimento. Neste sentido, como as células-tronco do saco vitelino (CTSV) não expressam antígenos do MHC, elas possuem a capacidade de escapar à rejeição imunológica, podendo ser utilizadas como uma população de células doadoras para receptores alógenos e xenogênicos (ESKOLA, 1977). Tais propriedades fazem dessas células as mais apropriadas para transplantes se comparado com as células totipotentes derivadas da mórula e com as células pluripotentes derivadas da massa celular interna do blastocisto. Por sua vez, as células diferenciadas provocam rejeição por histo-incompatibilidade doador-receptor. Tais características fazem das CTSV uma fonte de células-tronco relevante para a Terapia Celular (WILPSHAAR et al., 2002).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram coletados 3.564 úteros ovinos sem raça definida de diferentes idades gestacionais, no frigorífico Marfrig Alimentos, localizado na cidade de Promissão-SP; na fazenda Campo Verde, localizada na cidade de Jarinú-SP; e na Fazenda São Benedito, localizada na cidade de Jaboticabal-SP. Deste total de úteros, foram encontrados 87 embriões em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os sacos vitelinos utilizados para análises microscópicas foram dissecados no próprio local de coleta, mantidos em fixadores específicos e levados para o laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de São Paulo - SP. Os sacos vitelinos destinados para cultivo celular foram coletados a partir de úteros acondicionados em Tampão enriquecido com antibióticos e antifúngicos, mantidos refrigerados e conduzidos ao laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto - SP (HC-FMRP).

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os úteros foram dissecados em uma placa de Petri, retirando-se a membrana córioalantóide para uma melhor visualização do saco vitelino.

Os embriões juntamente com o saco vitelino e demais membranas placentárias foram fotografados com auxílio de câmera digital fotográfica SONY CYBERSHOT HX-1 para possibilitar uma avaliação dos parâmetros relativos ao desenvolvimento externo e proporções de tamanho dos embriões.

Foram aferidas medidas de Crown-Rump (CR) - medidas de distância coroa - sacro com auxílio de paquímetro inoxidável com divisões em milímetros (150mm/0,02mm) para estimar a idade gestacional dos embriões, comparando-as com a literatura especializada consultada (BRYDEN; EVANS; BINNS, 1972; EVANS; SACK, 1973; MELLOR; MATHESON, 1979). Com os parâmetros avaliados na literatura, pôde-se confeccionar uma tabela de estimativa das idades embrionárias coletadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Estimativa das idades embrionárias coletadas adaptadas a partir da literatura consultada

Idade (dias)	CR (mm)
14	0,9-1,8/2,0
15	3,2-4,0
16	4,0-4,4/5,0
17	4,5/5,0-6,0
18	4,5/5,5-6,0
19	6,0-7,0
20	5,0-7,0
21	7
22	8,0-9,0
23	9,0-10
24	11,0-12,0
25	12,5-13,0/14,0
26	14
27	15-16,0
28	17
29	17,5-18
30	19
31	20
32	21,0-22,0
33	23
34	24
35	24

Adaptação das avaliações feitas por Bryden, Evans e Binns (1972); Evans; Sack (1973); Mellor; Matheson (1979)

5.2 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Os sacos vitelinos foram separados dos embriões e fixados em solução de Karnowsky (fixador composto por Paraformol 4% e Glutaraldeído) ou Metacarn (fixador composto por Metanol, Clorofórmio e Ácido acético) e transportados para o laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - SP para processamento e posterior análise de microscopia óptica (microscopia de luz) e ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura).

5.2.1 Microscopia óptica

As membranas vitelinas foram fixadas em Metacarn por 7 horas e mantidas em Álcool 70% até processamento.

O material foi desidratado em série crescente de etanol (de 70 a 100%), diafanizado em xilol e incluído em Paraplast® (TOLOSA et al., 2003).

Os cortes foram obtidos com espessura de 5µm em micrótomo Polyartmicrótomo (LEICA) e em seguida corados rotineiramente por HE (Hematoxilina Eosina) (TOLOSA et al., 2003), para posterior análise fotomicroscópica do mesmo.

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Após 48 horas de fixação em Karnowsky, o material foi lavado 3 vezes em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 10 minutos, totalizando 30 minutos de imersão. Posteriormente o material foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio 4% (Polyscience, Inc. USA) por 2 horas e novamente lavado 3 vezes em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4) por 10 minutos.

A desidratação foi imposta de baterias de 15 minutos em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) passando em seguida em álcool absoluto por 4 vezes de 15 minutos. O ponto crítico foi obtido através do aparelho (CPD 020 – BALZERS UNION), onde todo o álcool foi retirado do material deixando-o totalmente seco para a metalização com ouro.

Como última etapa de processamento, as peças foram fixadas em “stubs” de alumínio com cola de carbono, deixadas em estufa por 12 horas para secagem e submetidas a banho de ouro no metalizador (EMITECH – K 550). As análises e eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO – 435 VP).

5.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Os sacos vitelinos fixados em Karnowsky foram lavados em tampão fosfato e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 4% (Polyscience, Inc. USA), lavados em solução salina e imersos em acetato de uranila (Polyscience, Inc. USA).

As membranas vitelinas foram lavadas novamente em tampão fosfato e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 a 100%). Em seguida permaneceram por 1 hora, sob agitação na mistura de 3:1 de acetona e resina (Araldite resin, grade 502, Polyscience, Inc. USA + DDSA, Polyscience, Inc. USA + DMP-30, Polyscience, Inc. USA), por 1 hora na mistura de 1:1 de acetona e resina, e por mais 1 hora em resina pura.

Posteriormente, as membranas vitelinas foram colocadas em moldes de silicone, contendo resina pura, e na estufa a 60° C, por 72 horas, para que ocorresse a polimerização da resina. Foram obtidos primeiramente os cortes semifinos de 1µm de espessura para observação em microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos, com cerca de 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados por acetato de uranila 2% (Polyscience, Inc. USA) em água destilada (5 minutos) e por citrato de chumbo 0,5% (Polyscience, Inc. USA) em água destilada (10 minutos). As observações e eletromicrografias sub-celulares foram realizadas em microscópio eletrônico MORGAGNI (modelo 268D, Philips).

5.2.4 Microscopia confocal

As membranas vitelinas de embriões em diferentes períodos de desenvolvimento previamente fixadas em Metacarn foram incluídas em Tissue-Tek® (Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens to ensure Optimal Cutting Temperature – Sakura®).

Os cortes foram corados com DAPI (100ng/ml, dihidroclorato de 4,6 diamino-2-fenilindol) (Abbott Molecular Inc.) para identificação do núcleo e marcado com os anticorpos primários feitos em camundongos: CD31 de células endoteliais (Novus Biologicals), CD41/CD61 de células hematopoéticas primitivas e progenitoras (AbD Serotec) e CD48 de linfócitos e macrófagos (Ab Nova) e com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Invitrogen) feito em cabra.

Foram obtidos cortes da membrana vitelina com 5µm de espessura em criostato. Todas as etapas necessárias para a marcação dos cortes foram realizadas a temperatura ambiente. Os cortes foram imersos em PBS overnight. Para reduzir a autofluorescência, os cortes foram incubados em solução de glicina (Plus One) 0,1M em PBS por 30 minutos e lavados repetidas vezes em PBS. Em seguida, foram permeabilizados com solução de TritonX-100 (Sigma) 0,3% em PBS por 1 hora, lavados consecutivas vezes com PBS e incubados por 1 hora em solução de bloqueio Bovine Serum Albumin (BSA) 1% (Sigma) em PBS.

Durante a incubação os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução BSA 1%, centrifugados a 10000rpm por 40 minutos à 4°C. O sobrenadante dos anticorpos primários (10µg/mL) foi adicionado ao corte e incubado por 1 hora em câmara úmida. Seguiu-se de consecutivas lavagens e posterior incubação com o anticorpo secundário juntamente com o DAPI (100ng/ml) por 1 hora em câmara úmida e ao abrigo da luz. Os cortes foram então incubados consecutivas vezes em PBS e imersos em água destilada antes da montagem da lâmina. Foi adicionado meio de montagem Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) aos cortes e cobertura com lamínula. As análises celulares foram feitas em microscópio confocal LSM 710 e software ZEIN 2008 (Carl Zeiss).

5.3 CULTIVO CELULAR

Os úteros coletados foram mantidos em solução tampão com antibióticos e antifúngicos e encaminhados ao laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro do HC-FMRP para serem processados no interior da capela de fluxo laminar, onde foram realizadas as dissecções.

5.3.1 Padronização do cultivo de células do saco vitelino

Para o cultivo das células da membrana vitelina foi necessário primeiramente estabelecer o tipo de processamento pré-cultivo e os meios de cultura ideais para os tipos celulares hematopoético e endotelial desejados.

A primeira etapa da padronização foi o estabelecimento do método mais adequado para obtenção da células do saco vitelino e para isso foram testados a maceração mecânica e a maceração mecânica + digestão enzimática.

Para isso, as membranas vitelinas foram lavadas em Solução Tampão Fosfato (PBS) e, posteriormente, maceradas manualmente (fragmentação mecânica). Uma porção das membranas foi submetida ao processo adicional de digestão enzimática com collagenase IV 0,5% por 1 hora até a obtenção de um homogeneizado celular. A inativação da collagenase foi realizada com meio de cultura contendo 15% de soro fetal bovino (SFB).

Após a maceração apenas mecânica e mecânica seguida de digestão, as células foram contadas em câmara de Neubauer 0.1mm (Bright-Line – N.Y. USA) utilizando o corante Turk na diluição de 1:100 e colocadas em meios de cultivo específicos para os tipos celulares desejados (Quadro 1). Porém, devido à maior quantidade de células obtidas pós digestão enzimática, definiu-se a utilização deste método de maceração em todos os cultivos posteriores.

A segunda etapa da padronização foi avaliar diferentes meios de cultivo (Quadro 1):

Meio de cultivo	Suplementação	Período de utilização	Tipo celular
Endothelial Cell Growth Medium Bullekit®-2 (EGM-2® Bullekit®) (Promocell)	10% de GIBCO™ Knockout™ Serum Replacement (KSR) (Invitrogen)	Após 24/48 horas iniciais	Fração aderente (células endoteliais)
Stem-Pro® (Invitrogen)	Citocinas e fatores de crescimento (IL-3, IL-6, IL-7, FLT-3, SCF e TPO), e 10% KSR (Invitrogen)	Após 24/48 horas iniciais	Fração em suspensão (células hematopoéticas)
Stem Span (preparado no laboratório*)	Citocinas e fatores de crescimento (SCF, IL-3, IL-6, FLT-3), e 20% de SFBi	Após 24/48 horas iniciais	Fração em suspensão (células hematopoéticas)
Dulbelcco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM HG) (Invitrogen)	20% de SFBi	Estabelecimento do cultivo. Durante as primeiras 24/48 horas de cultivo	Frações aderentes e em suspensão

Meio composto por IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – GIBCO™), albumina humana, insulina, transferrina, L-glutamina e solução de β-Mercaptoetanol. SFBi: Soro fetal bovino inativado

Quadro 1- Composição e período de utilização de diferentes meios para o cultivo de células do saco vitelino

O cultivo procedeu-se com o meio DMEM HG nas primeiras 24/48h e após este período as porções aderente e não aderente foram separadas e colocadas em meio para células endoteliais (EGM-2) e meio para células hematopoéticas (Stem-Pro ou Stem Span) respectivamente.

Nos períodos de 3, 6 e 9 dias (D+3, D+6 e D+9) uma parte das células cultivadas em suspensão foi coletada para extração de RNA e a porção restante mantida em cultura. O mesmo procedimento foi feito com as células aderentes, porém foi necessário proceder a tripsinização com tripsina EDTA (Cultilab) 1X por 4 minutos. Em ambos os experimentos as células foram mantidas em incubadora de 37°C com umidade relativa próxima de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

5.3.2 Ensaio de potencial de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose

Após a coleta do material, as amostras foram utilizadas para determinação da eficiência de formação de colônias em matriz de Metilcelulose® (MethoCult H4434). O protocolo foi adaptado a partir do utilizado para células humanas que corresponde a um valor numérico de 10-50 BFU-E por 10⁵ células plaqueadas. Isso significa que garrafas contendo menos de 10 BFU-E a partir de garrafas plaqueadas com 10⁵ células mononucleares indicam uma baixa eficiência na formação de colônias, garrafas contendo entre dez e cinquenta colônias plaqueadas com 10⁵ células mononucleares indicam uma quantidade desejável, e aquelas que contêm uma formação de colônias num valor numérico acima de 50 colônias plaqueadas com 10⁵ células mononucleares indicam uma alta eficiência na formação de colônias.

Porém para determinarmos essa eficiência de formação de colônias em células plaqueadas da espécie em questão adaptou-se a concentração previamente estipulada para o BFU-E humana. Para isso, necessitamos inicialmente estabelecer a concentração ideal na qual houvesse uma homogeneidade na formação das colônias.

5.3.3 Ensaio de formação de vasos rudimentares *in vitro*

Para verificar o potencial de formação de vasos das células-tronco do saco vitelino *in vitro* foi realizado o ensaio utilizando o sistema BD Matrigel™ (BD, Biosciences, EUA). Como controle positivo, células endoteliais humanas do cordão umbilical (HUVEC) foram cultivadas sob mesmas condições.

O matrigel (BD, Bioscience) foi retirado do freezer 24 h antes do experimento para descongelar a 4°C. Após isso, o matrigel foi homogeneizado e colocado no gelo (0°C). Em seguida foi colocado 300 µL do matrigel para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços (GREINER bio-one, Alemanha). A placa foi então colocada na estufa a 37°C durante 30 minutos para a solidificação do matrigel.

As CTSV e as HUVECs foram coletadas, transferidas separadamente para tubos cônicos de 15 mL (CORNING, NY, USA) e plaqueadas na concentração de 1×10^5 em volume de 200 µL do meio de cultivo específico EGM-2 (GIBCO-BRL, EUA) com 15% SFBi sobre a camada de matrigel conforme os grupos a seguir:

- 1) Grupo I: HUVECs + matrigel;
- 2) Grupo II: CTSV + matrigel;
- 3) Grupo III: CTSV + matrigel + HUVECs.

A placa foi mantida em cultura com 80% de umidade, a 37°C com 5% de CO₂.

As amostras foram visualizadas em microscopia de contraste de fase (Olympus, IX71) e as fotos registradas em câmera digital (Olympus U-TV0.5XC-3) 24h e 72h pós-incubação.

A obtenção e caracterização das HUVECs foram feitas de acordo com as metodologias descritas em Covas et al. (2008).

5.3.4 Ensaio de formação de vasos rudimentares *in vivo*

A capacidade de formação de redes vasculares pelas células-tronco do saco vitelino foi avaliada pelo ensaio angiogênico *in vivo*, utilizando-se o sistema BD Matrigel™ (BD,

Biosciences, EUA) em fêmeas murinas NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/ Severe Combined Immunodeficient), conforme protocolo previamente descrito por Melero-Martin et al. (2008).

O matrigel (BD, Bioscience) foi retirado do freezer 24 h antes do experimento para descongelar a 4°C e o material descongelado foi homogeneizado e mantido no gelo (0°C). Como controle positivo, células endoteliais humanas do cordão umbilical (HUVEC) foram cultivadas sob mesmas condições.

As células de ambos os grupos: SV (1×10^6), HUVEC (1×10^6) e SV (1×10^6) + HUVEC (1×10^6) foram submetidas a tripsinização, lavadas e ressuspensas em 350 µL de Matrigel (BD, Biosciences, EUA).

A mistura (células-matrigel) foi infundida subcutaneamente na região dorsal-cervical mediana de camundongos fêmeas de 8-10 semanas de idade utilizando seringas 26 gauges de 1mL (BD, Becton-Dickinson). Os animais foram infundidos apenas uma vez e cada condição experimental foi realizada em triplicata. Como controles negativos foram feitas infusões apenas de Matrigel

Após 2 semanas todos os animais foram sacrificados e os plugs de Matrigel removidos para avaliação de formação de vasos.

5.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A caracterização imunofenotípica das células vitelinas aderentes foi realizada com um painel de 7 anticorpos, sendo dois deles monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes: CD44-FITC (fluorescein isothiocyanate) (AbD Serotec) e CD45-PE (phycoerythrin) (AbD Serotec), e cinco deles indiretos: CD41/CD61 (AbD Serotec), CD14 (LifeSpan BioSciences), CD38 (BioLegend), CD31 (Novus Biologicals) e CD48 (Ab Nova). Para a marcação destes anticorpos indiretos foi necessária a utilização do anticorpo secundário Goat Anti Mouse FITC (BD Biosciences).

A marcação das células com os respectivos anticorpos monoclonais conjugados e indiretos foi realizada na ausência de luz e a temperatura ambiente. Amostras contendo 2×10^6 células foram incubadas com 0,5µg de anticorpo monoclonal por 20 minutos. Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com tampão PBS 1X e as células foram centrifugadas a 350 g durante 5 minutos para remoção do anticorpo em excesso e/ou não

ligado. Em seguida, as células marcadas com anticorpos primários conjugados CD44-FITC ou CD45-PE foram ressuspensas em 200µL de PBS 1X e imediatamente analisadas por software Cell Quest no citômetro FAC Sort (Becton Dickinson). As células marcadas com anticorpos primários não conjugados foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC por 1 hora, lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 200µL de PBS 1X e imediatamente analisadas por software Cell Quest no citômetro FAC Sort (Becton Dickinson).

5.5 MÉTODOS MOLECULARES

As metodologias moleculares abordadas nesta seção foram divididas em extração de RNA, síntese de cDNA, síntese de primers e reação de PCR em tempo real.

5.5.1 Extração do mRNA e síntese do cDNA

Inicialmente procedeu-se a extração de RNA total das membranas vitelinas, utilizando-se o Mini Kit RNeasy (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, a qualidade do RNA total foi avaliada por análise de eletroforese em gel de agarose e a pureza e concentração por razões de absorbância 260nm, 280nm e 230nm em espectrofotômetro (Nanovue, GE).

A análise da expressão do mRNA do RNA extraído da membrana vitelina (D+0) envolveu duas etapas: a) síntese do cDNA a partir de 2 µg de RNA total; b) amplificação do cDNA pela reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real (Real Time- PCR).

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity (Applied Biosystems) no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), através do protocolo: 25°C por 5 minutos e dois ciclos repetidos de 37°C por 60 minutos.

5.5.2 PCR em tempo real

PCR em tempo real (Real Time Polymerase Chain Reaction) é uma técnica que permite o monitoramento da reação de amplificação do cDNA de interesse em tempo real (Applied Biosystems). Esta técnica tem sido utilizada para propósitos diferentes, particularmente para a quantificação de ácidos nucleicos e para genotipagem.

Existem vários tipos de marcação fluorescente que podem ser usadas para a detecção dos produtos de PCR na reação de tempo real. Dentre elas, as mais utilizadas são as sondas TaqMan e o SYBR Green que é um ligante intercalante de DNA .

No presente estudo, foi utilizada a molécula fluorescente SYBR Green I, que interage com o DNA fita-dupla. Desta maneira, no início da reação a molécula interage com o cDNA da amostra, em seguida, a cada ciclo o cDNA é desnaturado, e como consequência a molécula fluorescente é liberada do mesmo. Posteriormente, ocorre a hibridação dos oligonucleotídeos específicos com o cDNA da amostra, seguida da extensão da sequência gênica de interesse. Nessa fase, ocorre novamente a interação da molécula SYBR Green com a molécula de cDNA dupla-fita recém formada. A reação prossegue, e após atingir um número de ciclos, a amostra encontra-se enriquecida no gene de interesse, o que permite um aumento na intensidade do sinal de fluorescência. Essas reações podem ser visualizadas em um gráfico de amplificação, onde o eixo X representa o número de ciclos da reação e o eixo Y indica a intensidade de fluorescência. Ao término da reação uma curva exponencial é gerada para cada amostra. A comparação do nível de amplificação do cDNA nas diferentes amostras é realizada após a definição do índice Ct (threshold cycle), o qual corresponde à intensidade de fluorescência onde todas as amostras amplificadas encontram-se na fase exponencial de amplificação.

A principal vantagem do PCR em tempo real, comparado com outros métodos de quantificação de ácidos nucleicos é a sua extensão extremamente ampla e dinâmica (mais de oito ordens de magnitude) (HEID et al., 1996), e a confiança significativamente alta dos resultados comparada com o PCR convencional, uma vez que com o PCR em tempo real todo o perfil de amplificação é conhecido.

Para a análise da expressão gênica por PCR em tempo real, foram utilizados os seguintes primers:

Genes	Forward	Reverse
FLK-1 sheep	5'-CCCTGATTACACCACACCAG-3'	5'-CCTCGTAGACCCTTTAGACAA-3'
RUNX-1 cow	5'-TGCGAGATTCAATGACCTCAG-3'	5'-GGTGGATGGTGTCTCGGTAG-3'
SCF sheep	5'-GTGTGATTTCTCCTCAACATCAAG-3'	5'-CTTACTGTCGTCATCGTCATTA-3'
VEGF sheep	5'-AGGCGACTGAAAGAAGGAACT-3'	5'-GCAAAAGTCTCGACCACCTC-3'
GATA-3cow	5'-TGGCATTCTTCTCCACAGAG-3'	5'-CACAAGATGAACGGACAGAAC-3'
TAL-1sheep	5'-CTTCCTCCTCCTGGTTCATTG-3'	5'-CAAGCTGATCCCCACACATC-3'
ALDH sheep	5'-GTGTTCTCTGATGTTACTGATG -3'	5'-CTGCTGATAACCCATAGAAAG -3'
LMO cow	5'-GGAGTTGATGAGGAGGTATCT-3'	5'-ATCCGTGCCTACGAGATGAC-3'
ANXA-5 cow	5'-CACAACCTCTGATGAGGGGTATG-3'	5'-GCAATTTGGAACAGCTTCTCC-3'
CD41 cow	5'-GCTGAGCCAAATCGCCCATA-3'	5'-TACATGGAGAGCCGTGCTGA-3'
CD150 sheep	5'-CCCTAAGAAGAGCCAGTATA-3'	5'-GAGCAACCCCATCAGCAACA-3'
GAPDH sheep	5'-TTTGGCATCGTGGAGGGACT-3'	5'-GCAGGGATGATGTTTTGGGC-3'

Quadro 2 - Sequências dos primers sintetizados e utilizados nas reações de PCR em tempo real

Devido ao fato de o genoma ovino não estar completamente caracterizado, buscou-se parear as seqüências de alguns genes de interesse com o genoma de organismos semelhantes à espécie ovina. Para obter tais resultados foram utilizadas as ferramentas encontradas no NCBI Blast. Depois de encontrada a homologia das seqüências com o genoma de bovino, os primers foram desenhados com auxílio do programa OligoExplorer, os quais encontram-se no quadro 2.

Para a análise dos resultados utilizamos a quantificação relativa com a amplificação de um gene endógeno, neste caso, o gene GAPDH ovino. Tanto os primers para os genes alvos quanto para o endógeno foram utilizados em uma concentração previamente padronizada de 2,5µM.

A etapa de amplificação do cDNA de todas as amostras foi realizada em duplicata, sendo que para amplificar cada gene utilizou-se um volume final de 15µl sob as seguintes condições: 2µl de cDNA (12,5ng/µl); 7,5µl de MasterMix SYBR Green; 1,0µl de cada primer (Forward e Reverse). O ciclo de amplificação utilizado foi: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As reações foram colocadas em micro placas de 96 poços e seladas com tampas ópticas (Applied Biosystems). A análise das amostras em duplicata mostra a reprodutibilidade das curvas de amplificação.

Após a amplificação, foi realizada a curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos) dos produtos amplificados para a determinação da temperatura de melting dos mesmos e avaliação da qualidade da amostra amplificada. Em ambos os casos observou-se um único pico indicando a ausência de produtos inespecíficos e de formação de dímeros mostrando a boa qualidade da reação.

Além disso, é interessante ressaltar que o cálculo de expressão das amostras foi baseado em Albesiano et al. (2003), o qual não utiliza amostras calibradores e apresenta os dados em unidades relativas de expressão (URE).

6 RESULTADOS

Foram realizadas 19 coletas totalizando 3.564 úteros, nos quais foram encontrados 87 embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Total de coletas realizadas, úteros coletados e quantidade de embriões encontrados

Coletas	Úteros (nº)	Embriões (nº)	Local
1	270	3	MARFRIG (Promissão)
2	300	0	MARFRIG (Promissão)
3	260	0	MARFRIG (Promissão)
4	290	4	MARFRIG (Promissão)
5	350	21	MARFRIG (Promissão)
6	3	0	Fazenda Campo Verde (Jarinú)
7	40	0	MARFRIG (Promissão)
8	365	11	MARFRIG (Promissão)
9	145	4	MARFRIG (Promissão)
10	175	20	MARFRIG (Promissão)
11	250	5	MARFRIG (Promissão)
12	250	0	MARFRIG (Promissão)
13	315	0	MARFRIG (Promissão)
14	135	1	MARFRIG (Promissão)
15	400	0	MARFRIG (Promissão)
16	3	4	Fazenda São Benedito (Jaboticabal)
17	3	5	Fazenda São Benedito (Jaboticabal)
18	4	4	Fazenda São Benedito (Jaboticabal)
19	6	5	Fazenda São Benedito (Jaboticabal)
Total	3.564	87	

6.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS EMBRIÕES E SACOS VITELINOS OVINOS

A literatura pertinente à embriologia ovina tem por característica métodos de avaliação e classificação que apesar de antigos, mostram ainda coerência em suas formas e aplicações. Dessa forma, optou-se por avaliar e descrever macroscopicamente o embrião da ovelha em suas diferentes fases gestacionais estimadas para posteriormente adquirir base teórica e observacional no intuito de melhor interpretar as fases celulares que os embriões possivelmente se encontrariam e obter melhor entendimento geral das características do saco vitelino e da placenta, aliado com a fase embriológica investigada.

Assim, pôde-se observar que o embrião ovino aos 15 dias de gestação (CR 4,1mm) apresenta-se envolto pela membrana amniótica, com presença do pedículo embrionário de onde partem os vasos, membrana corioalantóide vascularizada e saco vitelino partindo da porção ventral de coloração amarelada. Dentre as estruturas notáveis durante esta idade, observamos saliência cardíaca, estomodeu, encéfalo anterior, somitos, cauda, região dos arcos branquiais, neuróporo cranil fechando-se, região de fígado, local de formação da crista mesonéfrica (Figura 1). A partir do 18º dia de gestação (CR 5,8mm) observou-se a presença do cordão umbilical de onde partem vasos que se estendem por toda membrana corioalantóide. O broto do membro torácico nesta idade torna-se evidente (Figura 2).

Entre o 19º e 21º dia de gestação ovina (CR 6,4mm e 7,7mm respectivamente), observou-se embrião envolto pela membrana amniótica e imerso em líquido amniótico, com formação do cordão umbilical de onde partem os vasos que se ramificam por toda a formação da membrana corioalantóide, o saco vitelino de coloração alaranjada encontra-se vascularizado. No embrião, nesta fase, torna-se notável a presença de broto do membro torácico e broto do membro pélvico e formação dos arcos branquiais (Figuras 3, 4 e 5).

A partir do 22º dia de gestação ovina (CR 8,0mm e 8,7mm), seguindo-se o 23º (CR 10,2mm) e 24º (CR 11,3mm) observou-se aumento do líquido amniótico, cordão umbilical espesso, de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide. O saco vitelino de coloração alaranjada apresenta-se ainda vascularizado. Estruturas embrionárias se diferenciam, região de encéfalo subdivide-se em anterior, médio e posterior, presença de medula espinal, curvatura cervical, membro torácico e membro pélvico com extremidades em forma de pá e olhos com pigmentação de retina (Figuras 6, 7 e 8).

No período entre 25 (CR 13,4mm e 13,3mm), 26 (CR 14,1), 27 (CR 16,1mm), 28 (CR 16,99) e 29 (CR 17,8mm) dias de gestação nos embriões ovinos notou-se as diferenciações nas estruturas externas, após remoção da membrana corioalantóide vascularizada e membrana amniótica e líquido amniótico. Nesta fase o saco vitelino apresenta-se justaposto ao âmnio, com coloração laranja escuro e presença de vasos sanguíneos na membrana. Além das estruturas anteriormente descritas podemos evidenciar membro torácico e membro pélvico ainda em forma de pá, porém bipartindo-se para formação dos cascos, unidos ainda por uma fina membrana, diferenciação da porção rostral, formação de focinho e cavidade oral (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Cabe-se ressaltar, que na idade gestacional de 26 dias, o saco vitelino apresentou-se conectado à vasculatura coriônica ao longo da extensão desta membrana (Figura 11).

Aos 30 (CR 18,08), 31 (CR 19,65) e 32 dias de gestação (CR 22mm), o embrião ovino prepara-se para o período fetal, envolto pela membrana amniótica e membrana corioalantóide, presença de cordão umbilical de onde partem vasos que se ramificam por toda membrana, saco vitelino de coloração alaranjada, vascularizado, justaposto ao âmnio, externalizado em processo de involução. Os órgãos e estruturas externas tornam-se bastante evidentes e desenvolvidas, assim descritas: saliência cardíaca (coração contendo quatro câmaras), região de encéfalo (encéfalo subdividido em anterior, médio e posterior), medula espinal, cauda, fígado, membro torácico e membro pélvico com bipartição das extremidades, olhos com pigmentação de retina, costelas, curvatura cervical, região de quarto ventrículo, focinho, vascularização da derme, formação da orelha externa e formação da cavidade oral (Figuras 15, 16 e 17).

Legenda: A, observar embrião ovino em vista lateral direita, envolto pela membrana amniótica (a). Notamos a presença do pedículo de onde partem os vasos, membrana corioalantóide (mc) vascularizada (seta) e partindo da porção ventral do embrião o saco vitelino (sv), de coloração amarelada. Observar ainda as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), estomodeu (es), encéfalo anterior (ea), somitos (so), cauda (ca), região dos arcos branquiais (ab), neuróporo cranil fechando-se (nc), região de fígado (f), local de formação da crista mesonéfrica (cm).

Figura 1 - Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 15 dias (CR de 4,1 mm)

Legenda: A, observar embrião ovino em vista lateral direita, envolto pela membrana amniótica (a). Podemos observar a formação do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) de coloração amarelada e vascularizado. O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), somitos (so), cauda (ca), região de fígado (f), local da crista mesonéfrica (cm), broto do membro torácico (mt) e fechamento do neuróporo cranial (nc). B e C: Imagem ultrassonográfica evidenciando embrião (e) e vesícula embrionária (VE). Em C, gestação gemelar.

Figura 2 - Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 18 dias (CR de 5,8 mm)

Legenda: Em A e B observar embrião ovino em vista lateral esquerda, envolto pela membrana amniótica (a) imerso em líquido amniótico e formação do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos (seta azul) que se ramificam por toda a formação da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) de coloração alaranjada e vascularizado. O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), arcos branquiais (ab), somitos (so), cauda (ca), região de fígado (f), local da crista mesonéfrica (cm), broto do membro torácico (mt) e broto do membro pélvico (mp).

Figura 3 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 19 dias (CR de 6,4 mm)

Legenda: Em A observar membrana alantóide (ala) externalizada ao útero (ut). B observar membranas coriônica e alantoideana (mc) envolvendo o embrião. C, embrião ovino em vista lateral esquerda, envolto pela membrana amniótica (a) imerso em líquido amniótico e formação do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a formação da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) de coloração amarelada e vascularizado. O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), arcos branquiais (ab), somitos (so), região de fígado (f), local da crista mesonéfrica (cm), broto do membro torácico (mt) e broto do membro pélvico (mp).

Figura 4 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional exata de 20 dias (CR de 6,4 mm)

Legenda: A, observar embrião ovino em vista lateral direita, notar presença de cordão umbilical (co) de onde partem os vasos (setas) que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide (mc) e saco vitelino (sv) de coloração alaranjada e vascularizado. O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), arcos branquiais (ab), região de fígado (f), broto do membro torácico (mt) e broto do membro pélvico (mp).

Figura 5 - Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 21 dias (CR de 7,7 mm)

Legenda: A, B e C: observar embrião A em vista lateral direita e embriões B e C em vista lateral esquerda e envoltos pela membrana amniótica (a) e líquido amniótico internamente. Pode-se observar a formação do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) de coloração alaranjada e vascularizado. O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en) se subdividindo em anterior, médio e posterior, medula espinal (me), cauda (ca), região de fígado (f), curvatura cervical (cc), local da crista mesonéfrica (cm), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) com extremidades em forma de pá (somente na fotografia B) e olhos com pigmentação de retina (o).

Figura 6 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 22 dias (CR de A: 8,0 mm; B: 8,7 mm e C: 8,91mm)

Legenda: A, embrião (e) envolto por membrana corioalantóide (mc), vascularizada (setas) e iniciando as formações cotiledonárias (fc). Abaixo da membrana corioalantóide encontra-se a membrana amniótica.

Em B, observar embrião ovino em vista lateral esquerda, note a presença do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a formação da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) com coloração alaranjada enovelando-se ao cordão umbilical, saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), cauda (ca), região de fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp).

Figura 7 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 23 dias (CR de 10,2 mm)

Legenda: A, B: observar embrião (e) ovino em vista lateral direita, envolto pela membrana amniótica (a). Podemos observar a formação do cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) de coloração alaranjado escuro e vascularizado, justaposto ao âmnio.

Figura 8 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 24 dias (CR de 11,3 mm)

Legenda: A e B observar embrião (e) ovino em vista lateral esquerda e em C vista lateral direita, envolto pela membrana corioalantoide (mc) vascularizada. Abaixo da membrana corioalantoide encontra-se membrana amniótica (a) envolvendo o embrião e líquido amniótico. O saco vitelino (sv) apresenta-se justaposto ao âmnio, com coloração laranja escuro e presença de vasos sanguíneos na membrana.

Em B e C observe ainda cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantoide, saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), região de fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) com extremidades em forma de pá, olhos com pigmentação de retina (o), curvatura cervical (cc), região de focinho (fo) e formação da cavidade oral.

Figura 9 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 25 dias (CR de A e B 13,4 mm e C 13,3 mm)

Legenda: Observar em A e B embrião ovino em vista lateral direita, evidenciando formações cotiledonárias (fc) na membrana corioalantóide (mc) vascularizada. Em A observar membrana amniótica (a) envolvendo o embrião com líquido amniótico translúcido e em B líquido amniótico com extravasamento sanguíneo. O saco vitelino (sv) apresenta-se justaposto ao âmnio, com coloração avermelhada e presença de vasos sanguíneos na membrana.

Em C observa-se ainda cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a extensão da membrana corioalantóide, saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), região de fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) com extremidades em forma de pá, olhos com pigmentação de retina (o), curvatura cervical (cc), região de focinho (fo) e formação da cavidade oral.

Figura 10- Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 26 dias (CR 14,1mm)

Legenda: A, B e C: embriões ovinos em vista lateral direita. Observar em A membrana corioalantóide (mc) vascularizada (v) proveniente do cordão umbilical (co) revestindo todo o embrião (e), evidenciando um prolongamento do saco vitelino em "M". Em B observar saco vitelino alongado, de coloração laranja escuro na porção proximal e laranja claro em toda extensão distal do mesmo, membrana amniótica (a) com líquido amniótico translúcido, cordão umbilical (co) e formações cotiledonárias (fc) na membrana corioalantóide (mc). Em C dissecação permite visualizar justaposição da membrana vitelina (sv/segmento em azul) com a membrana amniótica (a) e alantóide (mal).

Figura 11- Fotografias de embrião ovino evidenciando saco vitelino em conexão com a vasculatura coriônica. Idade gestacional estimada de 26 dias (CR 14,1mm)

Legenda: A, observar gestação gemelar. Embrião (e1) em vista lateral esquerda e embrião (e2) em vista lateral direita, envolto por membrana corioalantóide (mc) vascularizada e abaixo desta, membrana amniótica em contato com embrião.

B: Embrião demarcado em A, em vista lateral esquerda, envolto pela membrana amniótica (a). Podemos observar a formação do cordão umbilical (co), saco vitelino (sv) externalizado ventralmente em processo de regressão com coloração alaranjada, região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt), membro pélvico (mp), olhos com pigmentação da retina (o), curvatura cervical (cc), região de focinho (fo).

Figura 12- Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 27 dias (CR de 16,1 mm)

Legenda: A, embrião ovino em vista lateral direita, apresentando membrana amniótica (a) e B embrião ovino envolto pela membrana amniótica (a), ventralmente parte o cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a membrana corioalantóide (mc), saco vitelino (sv) apresentando coloração laranja escura e presença de vascularização na mesma. Os embriões em A e B apresentam as seguintes estruturas: região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp), olhos (o) com pigmentação de retina, curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo (qv), focinho (fo) e vascularização da derme (d).

Figura 13- Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 28 dias (CR 16,99mm e 17,43mm)

Legenda: A, Embrião ovino em vista lateral esquerda, envolto pela membrana amniótica (a) e imerso em líquido amniótico, ventralmente parte o cordão umbilical (co) de onde partem os vasos que se ramificam por toda a membrana corioalantóide, saco vitelino (sv) apresentando coloração laranja escuro com vascularização visível (va). O embrião apresenta as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) iniciando bipartição das extremidades, olhos com pigmentação de retina, costelas (c), curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo (qv), focinho (fo), vascularização da dente (d) e formação da cavidade oral (*).

Figura 14- Fotografia de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 29 dias (CR de 17,8 mm)

Legenda: A, observar embrião (e) envolto pela membrana corialantóide (mc) intacta, apresentando vascularização (va) e necrose de membrana (nec). Em B, embrião envolto pela membrana corialantóide (mc) com presença de formações cotiledonárias (fc) e membrana amniótica (a) com grande quantidade de líquido amniótico abaixo da mesma. C observa-se saco vitelino (sv) de coloração vermelha escura distanciando-se da região ventral do embrião. Embrião apresenta saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) bipartidos, olhos com pigmentação de retina, curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo (qv), focinho (fo), vascularização da derme (d) e formação da cavidade oral (*).

Figura 15- Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 30 dias (CR de A: 18,08mm; B: 19,1mm e C: 19,94mm)

Legenda: A, observar embrião (e) envolto pela membrana amniótica (a) com grande quantidade de líquido amniótico, envoltos pela membrana corioalantóide (mc) apresentando formações cotiledonárias (fc) e vascularização (va). B, observa-se embrião envolto pela membrana amniótica (a), apresentando grande quantidade de líquido amniótico, saco vitelino (sv) de coloração avermelhada, extenso e fino. Evidencia-se ainda na figura B, dissecção da membrana alantóide (ala), a qual localiza-se justaposta, sobre o âmnio (a) e sob a membrana coriônica (mc). C, observar embrião ovino em vista lateral esquerda, cordão umbilical (co) em torção, saco vitelino (sv) de coloração avermelhada, vascularizado, justaposto ao âmnio interiozando-se junto ao cordão umbilical. Embrião apresentando as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) com bipartição das extremidades, olhos com pigmentação de retina (o), costelas (c), curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo (qv), focinho (fo), vascularização da derme (d), formação da orelha externa (oe) e formação da cavidade oral (*).

Figura 16- Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 31 dias (CR de A/B: 19,65mm e C: 20,54mm)

Legenda: A, B: observar embrião ovino em vista lateral esquerda, envolto pela membrana amniótica (a) e membrana corioalantóide (mc) seccionada, cordão umbilical (co) de onde partem vasos que se ramificam por toda membrana, saco vitelino (sv) de coloração alaranjada, vascularizado, justaposto ao âmnio interiozando-se junto ao cordão umbilical. Embrião com as seguintes estruturas: saliência cardíaca (sc), região de encéfalo (en), medula espinal (me), cauda (ca), fígado (f), membro torácico (mt) e membro pélvico (mp) iniciando bipartição das extremidades, olhos com pigmentação de retina (o), costelas (c), curvatura cervical (cc), região de quarto ventrículo (qv), focinho (fo), vascularização da derme (d), formação da orelha externa (oe) e formação da cavidade oral (*).

Figura 17 - Fotografias de embrião ovino. Idade gestacional estimada de 32 dias (CR de 22,0 mm)

6.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SACO VITELINO

A análise microscópica abrange os resultados referentes a microscopia óptica do saco vitelino, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal.

6.2.1 Microscopia óptica

Os sacos vitelinos obtidos apresentaram-se como uma estrutura trilaminar, com cada uma de suas camadas bem distintas e delimitadas. Uma das camadas revestindo a cavidade vitelina, chamada endoderme, possuía uma camada única de células endodermas; uma camada intermediária mesenquimal vascular, denominada mesênquima ou mesoderma e outra camada simples mesotelial voltada ao exoceloma, denominada mesotélio (Figura 18).

Na amostra do embrião de 15 dias observou-se grande quantidade de ilhas sanguíneas com pequena quantidade de células sanguíneas primitivas – provavelmente eritrócitos primários – em seu interior, circundadas por células endoteliais (Figura 18). Na amostra do embrião de 21 dias havia ilhas sanguíneas com grande quantidade de células sanguíneas primitivas no interior das mesmas, também circundadas por células endoteliais. As células endodermas encontravam-se em estado de apoptose (Figura 19).

Nas amostras dos embriões com idade estimada de 22 dias as ilhas sanguíneas mostravam-se cheias e grandes localizadas no mesênquima vitelino, possuindo grandes quantidades de eritrócitos primários em seus interiores. O epitélio vitelino apresentou-se globoso, colunar e íntegro em uma camada apoiada sobre o mesênquima vitelino, formando pequenas rugas na luz da membrana vitelina. Neste período embrionário as membranas vitelinas apresentavam características semelhantes as do período anterior, no entanto, as ilhas vasculares apresentavam-se mais desenvolvidas e com maior quantidade de células sanguíneas nucleadas primitivas (Figuras 20 e 21).

Os sacos vitelinos dos animais com idade estimada de 23 dias apresentavam características semelhantes às descritas para o período anterior. O epitélio vitelino apresentava-se globoso e colunar com presença de ilhas sanguíneas em toda a extensão da

membrana. A maioria das ilhas apresentavam-se desenvolvidas e cheias, com grande quantidade de células sanguíneas. No entanto, ao longo da membrana vitelina foram observadas algumas ilhas sanguíneas com pequenas quantidades de células sanguíneas no interior (Figura 22). Ainda na idade de 23 dias, foi possível observar células sanguíneas anucleadas no interior de alguns pequenos vasos sanguíneos (Figura 23).

Nas membranas vitelinas dos embriões com idade estimada de aproximadamente 25 dias, algumas mudanças foram observadas em relação ao tamanho das ilhotas sanguíneas e a característica de apoptose das células internas dessas estruturas. Em um dos animais foi observada uma ilha sanguínea de grande tamanho e apoptose das células sanguíneas e das células do mesênquima em toda a extensão da membrana (Figura 24).

Legenda: E11C8 (CR 4mm – IE 15d). Em A vista panorâmica da membrana vitelina. Aumento de 4x. Observar em B e D ilhotas sanguíneas (is) com pouca quantidade de células sanguíneas (setas vazadas), circundadas por células endoteliais (setas). Em C observar as camadas Endoderma (Ed), Mesoderma (Md) e Mesênquima (Mq) do saco vitelino. Aumento de 40x. Observar em E ilhotas sanguíneas fusionando-se (tracejado). Em F, ilhota sanguínea sem células sanguíneas, evidenciando células endoteliais (seta) e endoderma vitelino apresentando células com formato globoso (gb), prismático (pr) e células apresentando 4 nucléolos (setas amarelas). Aumento de 100x. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 18- Fotomicrografias de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 15 dias

Legenda: E8C8 (CR 7,7mm – IE 21d). Em A vista panorâmica da membrana vitelina. Aumento de 10x. Em B, representado em A, observar células mesodermais em apoptose (ap). Ilhotas sanguíneas (is) com grande quantidade de células sanguíneas primitivas (seta vazada) circundadas por células endoteliais (seta) e o lúmen da membrana (L). Aumento de 40x. Em C ilhotas sanguíneas (is) com grande quantidade de células sanguíneas (setas vazadas) em seu interior, circundadas por células endoteliais (setas). Em D, células do endoderma (Ed) com formato globoso (gb) e prismático (pr), e região de mesoderme (Md) apresentando fibras de colágeno (col). Aumento de 100x. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 19- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 21 dias

Legenda: E7C8 e E10C8 – (CR 8mm e 8,7mm – IE 22d). Em A vista panorâmica da membrana vitelina evidenciando grande quantidade de ilhas sanguíneas (setas) de diferentes tamanhos em toda a extensão da membrana. Aumento de 4x. Em B observar ilhotas sanguíneas (is) revestidas por células endoteliais (setas) vazias e pequenas, e com grande quantidade de células sanguíneas primitivas (seta vazada) em seu interior. Aumento de 40x. Observar em C ilhota sanguínea (is/ pontilhado) repleta de células sanguíneas em seu interior (seta vazada) revestida por uma camada de células endoteliais espessa na face endodermal (Ed) e delgada na face mesodermal (Md). Em D ilhota sanguínea (is/ pontilhado) formada por células endoteliais (setas) e pouca quantidade de células sanguíneas (seta vazada) no interior da mesma. Aumento de 100x. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 20- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 22 dias

Legenda: E7C8 e E10C8 – (CR 8mm e 8,7mm – IE 22d). Em A e B observar as três camadas do saco vitelino: endoderma (Ed), mesoderma (Md) e mesênquima (Mq). Em C ilhotas sanguíneas (is) localizadas na região mesenquimal (Mq) do saco vitelino. Aumento de 40x. Observar em D ilhotas sanguíneas (is) de diferentes tamanhos com grande quantidade de células sanguíneas (setas vazadas) em seu interior, circundadas por células endoteliais (setas) com núcleo alongado e periférico (seta amarela) e arredondado e central (seta laranja). Aumento de 100x. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 21- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 22 dias

Legenda: E9C8 (CR 9,6mm – IE 23d). Em vista panorâmica, observar em A ilhotas sanguíneas com grande quantidade de células sanguíneas primitivas (setas vazadas) e ilhotas sanguíneas circundadas apenas pelas células endoteliais, com ausência ou pouca quantidade de células sanguíneas em seu interior (setas), em toda a extensão da membrana vitelina. Aumento de 10x. Em aumento de 40x B e C, representados em A, ilhotas sanguíneas com grande quantidade de células sanguíneas primárias (setas vazadas) e com esparsa quantidade de células sanguíneas (setas). Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 22- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E5C11 (CR 9,62mm – IE 23d). Em vista panorâmica, observar em A ilhotas sanguíneas (setas) em toda a extensão da membrana vitelina. Aumento de 4x. Em B e C representados em A observar região de mesoderma (Md) apresentando fibras de colágeno e tubo endotelial (te) decorrente de fusão das ilhotas sanguíneas com células sanguíneas estabelecendo a circulação vitelina. Aumento de 40x e 100x respectivamente. Em D e E um aumento de 100x evidencia tubos endoteliais possuindo células sanguíneas anucleadas (hem) e células sanguíneas primitivas no interior dos mesmos. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 23- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E2C1 e E3C1 (CR 13,4mm e 13,3mm – IE 25d). Em vista panorâmica, observar em A ilha sanguínea (is) de grande tamanho (delimitada em vermelho) com grande quantidade de células sanguíneas primitivas (setas vazadas) em estado de apoptose (ap), visualizado em B. Observar em C ilhas sanguíneas vazias em toda a extensão da membrana vitelina (setas) e em D apenas a delimitação das ilhotas pelas células endoteliais (setas) com ausência de células sanguíneas em seu interior. A e C aumento de 20x, B e D aumento de 60x. Coloração de Hematoxilina Eosina.

Figura 24- Fotomicrografia de microscopia óptica do saco vitelino de embriões ovinos de idade gestacional estimada de 25 dias

6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram que na idade de 25 dias, as membranas vitelinas apresentavam vasos sanguíneos com células sendo liberadas na luz dos vasos e ducto vitelino (Figura 25). Apresentava também longos tubos endoteliais, estruturas arredondadas e escamosas, sugestivo de apoptose (Figura 26), cavidades vazias com estruturas esféricas de pequeno tamanho (Figura 27), elevações não uniformes na região externa (Figura 28), região de textura esponjosa e região de aspecto escamoso (Figura 29), presença de estrutura globosa (Figura 30), evidente torção sofrida pela membrana vitelina em estágio de regressão, intercomunicação entre tubos endoteliais (Figura 31), e região com microvasos sanguíneos apresentando fenestrações, localizados na superfície endodérmica da membrana (Figura 32).

Aos 26 dias a membrana vitelina apresentava intercomunicação de vasos sanguíneos na superfície endodérmica, célula de grande tamanho apoiada na superfície endodérmica (Figura 33), torção da porção proximal da membrana vitelina (Figura 34), cavidades e elevações globosas formando tubos endoteliais (Figura 35), células e partículas sendo expelidas pelas elevações globosas (Figura 36).

Na idade embrionária estimada de 27 dias foi possível observar tubo endotelial sobressalente, vesículas agrupadas, célula de grande tamanho sobreposta e aderida à superfície endodérmica com células endodérmicas bem delimitadas (Figura 37).

Aos 29 dias a membrana vitelina apresentava nichos de células sanguíneas liberadas no interior da membrana, grande quantidade de partículas e células liberadas por toda a superfície externa da membrana, escamação epitelial da porção proximal da membrana vitelina e região de intensa escamação, sugerindo apoptose, localizada na porção distal do saco vitelino (Figuras 38 e 39).

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observar em vista frontal, porção proximal em A e porção distal do saco vitelino em B, com presença de vasos sanguíneos (setas vermelhas) e ducto vitelino (círculo). Em C, representado em B, células sendo liberadas na luz dos vasos. Em D observar sobreposição em camadas da região externa da membrana vitelina, evidenciando em E o lúmen da membrana (L) .

Figura 25- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observar em A e B longos tubos endoteliais apresentando regiões espessas (arcos vermelhos) e regiões delgadas (arcos verdes), com estruturas aderidas nos mesmos (*). Em C e D evidencia-se estruturas arredondadas e escamosas, sugestivo de apoptose (ap) nessas regiões. Em E e F evidencia-se em maior aumento cavidades maiores (setas amarelas) e menores (círculos vermelhos) presentes em toda a extensão da membrana vitelina.

Figura 26- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observar em A aberturas rasas separando camada externa (cex) e camada interna (cin) da membrana vitelina. Em B observar cavidades vazias e fundas (setas vazadas azuis) e estruturas esféricas e compactas de pequeno tamanho (setas laranjas). Evidencia-se em C cavidades abertas, vazias e fundas (setas vazadas azuis), apresentando fibras de aderência (setas rosas) entre as porções superior (psu) e inferior (pif).

Figura 27- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observar em A porção distal da membrana vitelina, permitindo visualização da região interna (rgin) da membrana em B. Evidencia-se em C superfície interna da membrana vitelina, apresentando elevações de organização não uniforme (pontilhado verde).

Figura 28- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Em A observar estrutura sobreposta à membrana vitelina, apresentando região de textura esponjosa (esp), representado em maior aumento em B, e região de aspecto escamoso (esc), evidenciada em C. Observa-se em D região endodérmica formada por agrupamentos de fibras (traço ponto) e em E presença de estrutura globosa (glb), células (cel) e cavidades vazias (cav).

Figura 29- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E16C5 (CR 13,8mm – IE 25d). Observa-se em A vista panorâmica da membrana vitelina evidenciando torção (tor) da mesma. Em B, observa-se na porção proximal do saco vitelino grande quantidade de vasos sanguíneos (v) de pequeno calibre e vasos sanguíneos de maior calibre (*) obstruídos pela torção da membrana. C e D evidenciam E e F em maior aumento. E observa-se internamente intercomunicação (tracejado) entre tubos endoteliais e em F pode-se observar células (cel) surgindo da camada endodérmica em toda a superfície interna da membrana.

Figura 30- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E16C5 (CR 13,8mm – IE 25d). Observar em B, esquematizado em A, região fibrosa (fbr) da membrana vitelina, possuindo tubos endoteliais (te) sobrepostos a mesma. Em C observa-se vaso sanguíneo (v) aberto contendo célula em seu interior. Evidencia-se em E, representado em D, microvasos sanguíneos apresentando fenestrações, localizados na superfície endodérmica da membrana.

Figura 31- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E13C5 (CR 14,6mm – IE 26d). Observar em A vasos sanguíneos (v) intercomunicando-se uns com os outros evidentes na superfície endodérmica. Em B evidencia-se formação de cavidade (cav) na superfície endodérmica. Observa-se em C grande quantidade de células surgindo das cavidades (cav) evidenciadas em maior aumento em D. Em E e F em maior aumento observa-se célula achatada e côncava de grande tamanho apoiada na superfície endodérmica (*).

Figura 32- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 26 dias.

Legenda: E13C5 (CR 14,6mm – IE 26d). Observar em A saco vitelino em menor aumento, evidenciando torção (tor) da porção proximal, uma região embrionária (rgemb), a qual fica em contato com o embrião. B evidencia desorganização epitelial, sugerindo apoptose (apt) devido ao início de regressão deste órgão.

Figura 33- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 26 dias.

Legenda: E11C5 (CR 15,7mm – IE 27d). Observar em A superfície possuindo elevações globosas (glb) e cavidades. Em B evidencia-se elevações formando tubos endoteliais (te/pontilhado). Em C, representado em A, e em D pode-se observar células sanguíneas bicôncavas de diversos tamanhos (hem) sendo liberadas pelas cavidades (cav).

Figura 34- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias.

Legenda: E14C5 (CR 15,1mm – IE 27d). Observar em A e B elevações globosas (glb) em toda a superfície do saco vitelino. C, D e E evidenciam células (cel) e outras partículas (prt) sendo expelidas dessas elevações. Em F, entende-se pela cavidade vazia e funda (cav) que a mesma possivelmente expeliu/secretou células e/ou partículas anteriormente.

Figura 35- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias.

Legenda: E14C5 (CR 15,1mm – IE 27d). Em A observar representações das imagens B, C e F. Observar ainda em A, tubo endotelial sobressalente (tracejado laranja). Em B observa-se cavidade (cav) e em C vesículas agrupadas (setas). Em D evidencia-se uma dessas vesículas em profundidade. Em E observa-se uma estrutura endodérmica (end) de grande tamanho de formato arredondado sobreposta e aderida à superfície endodérmica (end) do saco vitelino.

Figura 36- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias.

Legenda: E14C5 (CR 15,1mm – IE 27d). Observar em A e B porção proximal do saco vitelino com aspecto escamoso e cavidades bem delimitadas e vazias (setas laranjas). C e D evidenciam torção sofrida pelo saco vitelino em fase de regressão, presença de vasos sanguíneos (v), células endodermiais delimitadas (cEd), rompimento de cavidade (cav) e escamação epitelial compacta (esc).

Figura 37- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 27 dias.

Legenda: E15C5 (CR 17,8mm – IE 29d). Observar em A porção distal da membrana vitelina em vista panorâmica, permitindo visualização da região interna (rgin) da mesma. Em B, representado em A, observa-se nichos (*) de células sanguíneas liberadas no interior da membrana. Em C e D observa-se sobressalência de um tubo endotelial (te/tracejado) apresentando uma cavidade (seta vazada azul) na região mediana do mesmo e grande quantidade de partículas e células liberadas por toda a superfície externa da membrana. Em E evidencia-se escamação (esc) epitelial da porção proximal da membrana vitelina, sugerindo apoptose.

Figura 38- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 29 dias.

Legenda: E15C5 (CR 17,8mm – IE 29d). Observa-se em A ilha sanguínea de grande tamanho repleta de células sanguíneas (cel) em seu interior. Em B, representado em A, e em maior aumento em C observa-se estrutura de grande tamanho, formada por microtúbulos em formato de bacilus. Em D porção proximal do saco vitelino apresentando região de escamação (esc). Evidencia-se em E região de intensa escamação localizada na porção distal do saco vitelino.

Figura 39- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 29 dias.

6.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural da membrana vitelina foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão. Aos 23 dias de idade embrionária estimada, foram evidenciadas vesículas localizadas na região endodérmica do saco vitelino, com presença de células sanguíneas no interior da mesma e com ausência de endotélio circundando a células sanguíneas (Figura 40), células sanguíneas nucleadas e anucleadas, agrupadas e delimitadas por células endoteliais na região mesotelial (Figura 41), células sanguíneas contendo mitocôndrias dispersas (Figura 42), células epiteliais contendo núcleo alongado, retículo endoplasmático rugoso, desmosomos, prolongamentos de membrana, microvilos localizados na porção apical da célula, complexo de Golgi e vacúolos (Figura 43).

Observou-se também que algumas células epiteliais apresentavam uma reorganização citoplasmática e de organelas (Figura 44).

Além disso, a membrana vitelina apresentou células sanguíneas nucleadas e anucleadas claras e escuras, envoltas por matriz de colágeno (Figura 45), formação de vasos por célula endotelial apresentando mitocôndria, núcleo, vesículas de secreção e extravasamento de citoplasma para a região extracelular (Figura 46), célula epitelial contendo núcleo e feixes de fibrilas de colágeno (Figura 47).

Em corte longitudinal, foram observadas células endodérmicas apresentando núcleo centralizado, nucléolo evidente, estruturas eletrodensas, retículo endoplasmático liso e prolongamentos de membrana e vaso sanguíneo, localizado na região mesenquimal do saco vitelino, com células sanguíneas nucleadas em seu interior (Figura 48).

Na figura 49 foi possível visualizar as três camadas formadoras da membrana vitelina: região epitelial ou endodérmica, região mesenquimal com células sanguíneas nucleadas e endotélio delimitando região mesotelial.

Observou-se também, desintegração de células epiteliais e célula com coloração escurecida (Figura 50), região endodérmica apresentando compartimentos celulares claros e escuros sem delimitação de membrana celular e com ausência de núcleo, célula epitelial com citoplasma de coloração clara, apresentando retículo endoplasmático rugoso, vesícula localizada no citoplasma com feixe de fibras colágenas em seu interior (Figura 51).

Nesta idade embrionária também foi notada a presença de grande quantidade de material eletrodenso no citoplasma das células sanguíneas e das células epiteliais da endoderme.

Aos 25 dias de idade embrionária estimada, a análise da microscopia eletrônica de transmissão da membrana vitelina evidenciou presença de ilhas sanguíneas na região mesenquimal do saco vitelino com grande quantidade de células sanguíneas e também células sanguíneas localizadas na região endodermal com ausência de endotélio (Figura 52), presença de célula sanguínea infiltrada no epitélio sem delimitação endotelial (Figuras 53 e 54).

Na figura 55 foi possível observar as três camadas da membrana vitelina: endoderma formada por uma camada simples epitélio, mesênquima onde se localizam as ilhas sanguíneas e mesotélio; célula endotelial de morfologia arredondada contendo núcleo, vesículas de secreção e estruturas de coloração acinzentada semelhantes a células sanguíneas localizadas na região do citoplasma, e desintegração e/ou reorganização celular.

Na região mesenquimal do saco vitelino foram observadas ilhas sanguíneas de grande tamanho (Figura 56), região mesotelial com uma vesícula de grande tamanho sem delimitação endotelial (Figura 57), ilha sanguínea circundada por endotélio, sem presença de células sanguíneas, localizada na região mesenquimal do saco vitelino (Figura 58), feixes de fibras colágenas localizadas na região citoplasmática da célula endotelial e presença de microvilos na região mesotelial. Encontrou-se também uma célula multinucleada, apresentando retículo liso, vesículas secretoras e feixes de colágeno (Figura 59).

Foram observadas células endodérmicas apresentando citoplasma de coloração clara, núcleo de pequeno tamanho com predominância de eucromatina, presença de grande quantidade de mitocôndrias, mitocôndrias edemaciadas, desmossomos, microvilos e grânulos eletrodensos, localizados na superfície dos microvilos. Também foi observada célula endodérmica com morfologia arredondada e citoplasma de coloração acinzentada, núcleo envolto por membrana nuclear apresentando condensações de cromatina em forma de heterocromatina e presença de grande quantidade de vesículas de secreção (Figura 60).

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A, observar em corte semi-fino vesícula endodérmica (ve) na porção de tecido epitelial em região endodérmica (seta). Em B e C notar a presença de célula sanguínea (cs) no interior da vesícula e material eletrodense (setas amarelas) em todo o interior das células endodérmicas. Em C, entre as células epiteliais presença de microvilos na porção apical (seta vazada). Ausência de endotélio circundando a célula sanguínea.

Figura 40- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A, B observar células sanguíneas nucleadas e anucleadas, agrupadas e delimitadas por células endoteliais (setas) na região mesotelial do saco vitelino. C, D fragmento celular possuindo organelas envolto por célula sanguínea. Nota-se a presença de grande quantidade de material eletrodenso nas células sanguíneas e nas células epiteliais da endoderme.

Figura 41- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A, células endoteliais formam vaso sanguíneo na camada de mesotélio, células sanguíneas (cs) nucleadas estão presentes. B, aumento da fotomicrografia A, visualiza-se célula sanguínea contendo núcleo (n) e mitocôndrias dispersas (mt). C e D, células epiteliais contendo núcleo alongado, retículo endoplasmático rugoso (rer), desmossomos (des), prolongamentos de membrana (pm) que se interdigitam e microvilos localizados na porção apical da célula (seta vazada). E, aumento da porção de matriz celular epitelial, visualizamos as seguintes organelas: complexo de golgi (cg), retículo endoplasmático rugoso (rer), desmossomos (des), vacúolos (vac), prolongamentos de membrana (pm) e ausência de matriz extracelular entre as células.

Figura 42- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). Região apical do saco vitelino apresentando porção de epitélio com células com coloração citoplasmática acinzentada, núcleo acompanhando formato das células, com condensações de cromatina em forma de heterocromatina. Em B, observa-se núcleos (n) de duas células distintas envolvidos pela membrana nuclear, próximas à membrana celular. Não foi possível observar presença de organelas. C, observa-se uma reorganização de citoplasma e organelas entre as células do epitélio vitelino (*), presença de mitocôndrias (mtc) delimitadas por membrana celular das células sanguíneas nucleadas.

Figura 43- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A, Células sanguíneas nucleadas (n) e anucleadas (an) claras e escuras, envoltas por matriz de colágeno. B, aumento de fotomicrografia A, feixes de fibras de colágeno (col). Nota-se em C, núcleo da célula sanguínea com heterocromatina periférica.

Figura 44- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). Observa-se região endodérmica (Ed) da membrana vitelina com células apresentando citoplasma acinzentado com pontos eletrodensos (setas), núcleos de formatos variados (n). Em B, região aproximada de célula endotelial (ce) apresentando mitocôndria (mtc), núcleo (n), vesículas de secreção (ve), e extravasamento de citoplasma (ctp) para a região extracelular (rec).

Figura 45- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A, Célula epitelial contendo núcleo, contendo feixes de fibrilas de colágeno (col). C, célula endotelial (ce) com presença de mitocôndrias (mtc), retículo endoplasmático rugoso (rer), condensações de material eletrodenso (med), célula sanguínea nucleada (cs) e fibrilas de colágenos organizando-se. B, D: célula endotelial com condensações de material eletrodenso (med), mitocôndrias (mtc) e retículo endoplasmático rugoso (rer) organizado. E, F: Células sanguíneas nucleadas com alguns fragmentos celulares (fc) aderidos, outros soltando-se das células sanguíneas e agrupando-se entre a camada de endotélio.

Figura 46- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A: observa-se células endodérmicas, em corte longitudinal. Em maior aproximação, B, C, D e E: células endodérmicas apresentando núcleo (n) centralizado, nucléolo evidente (ncl), estruturas eletrodensas (setas), retículo endoplasmático liso (rel) e prolongamentos de membrana (setas vazadas). F: vaso sanguíneo (v) localizado na região mesenquimal do saco vitelino, com células sanguíneas nucleadas em seu interior.

Figura 47- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A: Membrana vitelina apresentando região epitelial (Ed), região mesenquimal (Msq) com células sanguíneas nucleadas (cs) e endotélio (ce) delimitando região mesotelial (Mst). Em B e C, observa-se células sanguíneas nucleadas (cs), com condensações de cromatina na periferia e aglomerados mais ao centro, mitocôndrias (mtc) e citoplasma acinzentado.

Figura 48- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). Desintegração de células epiteliais. Célula com coloração escurecida (*) e ausência de núcleo.

Figura 49- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). Região endodérmica (Ed) apresentando compartimentos celulares claros e escuros sem delimitação de membrana celular e com ausência de núcleo. Nota-se presença de agrupamento de células sanguíneas (*) na região endodérmica sem delimitação endotelial. Observa-se ainda, pontos de material eletrodense (setas) em toda a extensão endodérmica.

Figura 50- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E1C1 (CR 10,2mm – IE 23d). A: célula epitelial com citoplasma de coloração clara, apresentando núcleo (n) envolto por membrana nuclear acompanhando o formato da célula. Em B, observa-se retículo endoplasmático rugoso (rer), presença de vesícula (ve) localizada no citoplasma com feixe de fibras colágenas (col) em seu interior.

Figura 51- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 23 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). A, observar em corte semi-fino presença de ilhas sanguíneas (is) na região mesenquimal com grande quantidade de células sanguíneas (cs) e células sanguíneas (setas vermelhas) localizadas em região endodermal com ausência de endotélio (*).

Figura 52- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observa-se em A, região endodérmica e mesotelial, em corte longitudinal. Notar presença de célula sanguínea (cs) infiltrada no epitélio, sem delimitação endotelial e presença de ilha sanguínea com células sanguíneas no interior. Em B, evidencia-se célula endodérmica, apresentando núcleo (n) envolto por membrana nuclear, três nucléolos (ncl), retículo endoplasmático rugoso (rer) e desmossomos (des). C, observa-se feixes de fibras colágenas (col) cortadas transversalmente e presença de microvilos (seta vazada) na região mesotelial da membrana.

Figura 53- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Corte em plano superficial, observar região endodérmica apresentando estruturas arredondadas escurecidas (setas), células sanguíneas anucleadas infiltradas nesta região (*), célula endotelial (ce) e presença de microvilos na região mesotelial

Figura 54- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). A, célula epitelial, com núcleo (n) ocupando o centro da célula, com condensações de cromatina localizadas próximas a membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso (rer), prolongamento de membrana (seta) com aparente retração de membrana (*). B, evidencia-se presença de ilha sanguínea (is) circundada por endotélio (ce), possuindo células sanguíneas nucleadas (n) e anucleadas (an) no interior, localizada na região mesenquimal (Msq) abaixo da região de epitélio.

Figura 55- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observa-se em A, as três camadas da membrana vitelina: endoderma (end) formada por uma camada simples epitélio, mesênquima (Msq) onde localiza-se as ilhas sanguíneas e mesotélio (Mst). Em B, representado em A, observa-se uma célula endotelial de morfologia arredondada contendo núcleo (n), vesículas de secreção (ve) e estruturas de coloração acinzentada semelhantes a células sanguíneas (*), localizadas na região do citoplasma. Observa-se também desintegração e/ou reorganização celular (seta). Em C, nota-se a presença de microvilos (seta vazada) na região apical das células epiteliais e desmossomos (des).

Figura 56- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). A, ilhas sanguíneas (is) de grande tamanho, localizadas na região mesenquimal do saco vitelino. Em B, representado em A, observa-se desintegração e/ou reorganização celular de uma estrutura localizada no interior da ilha sanguínea.

Figura 57- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Região mesotelial apresentando uma vesícula (ve) de grande tamanho sem delimitação endotelial. Células sanguíneas (cs) anucleadas com citoplasma de coloração acinzentada. Em B, observa-se feixes de fibra colágena (col) cortadas transversalmente, delimitadas por membrana da matriz celular (seta).

Figura 58- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observa-se em A, ilha sanguínea (is) circundada por endotélio, sem presença de células sanguíneas, localizada na região mesenquimal do saco vitelino. Notar presença de feixes de fibras colágenas localizadas na região citoplasmática da célula endotelial (ce) e presença de microvilos (seta vazada) na região mesotelial (Mst). Em B, representado em A, observar célula multinucleada (n) retículo liso (rel) circundando internamente a membrana celular, vesícula secretora (ve) e feixes de colágeno (col).

Figura 59- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

Legenda: E21C5 (CR 13,7mm – IE 25d). Observa-se em A, células endodérmicas apresentando citoplasma de coloração clara, núcleo (n) de pequeno tamanho com predominância de eucromatina envolto por membrana nuclear, presença de grande quantidade de mitocôndrias (mtc), mitocôndrias edemaciadas (*), desmossomos (des), microvilos (seta vazada) e grânulos eletrodensos localizados na superfície dos microvilos (setas tracejadas). Em B, observa-se célula endodérmica com morfologia arredondada apresentando citoplasma de coloração acinzentada, núcleo (n) acompanhando a morfologia da célula, envolto por membrana nuclear e apresentando condensações de cromatina em forma de heterocromatina, presença de grande quantidade de vesículas (ve) de secreção.

Figura 60- Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional estimada de 25 dias.

6.2.4 Microscopia confocal

A imunofluorescência da membrana vitelina, analisada por microscopia confocal, evidenciou uma forte marcação de CD31 (específico de células endoteliais) em células endodérmicas e em células endoteliais da região mesenquimal do saco vitelino (Figuras 61, 62 e 63).

Observou-se também marcação do anticorpo CD41/CD61 (marcador de células hematopoéticas primitivas e progenitoras) em algumas regiões endodérmicas (Figura 64) e marcação extracelular generalizada do anticorpo CD48 (marcador de linfócitos e macrófagos) (Figura 65).

Legenda: Observar em A núcleos celulares corados com DAPI. Em B e C marcação de CD31 em células endodérmicas (setas vazadas) e endoteliais (seta).

Figura 61- Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.

Legenda: Observar em A núcleos celulares corados com DAPI. Em B e C, marcação de CD31 em células endodérmicas (setas vazadas) e endoteliais (setas).

Figura 62- Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.

Legenda: Observar em A núcleos celulares corados com DAPI. Em B e C marcação de CD31 em células endodérmicas (setas vazadas) e endoteliais (seta).

Figura 63- Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.

Legenda: Observar em A núcleos celulares corados com DAPI. Em B e C marcação de CD41/CD61 em células endodérmicas.

Figura 64- Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.

Legenda: Observar em A núcleos celulares corados com DAPI. Em B e C marcação extracelular generalizada de CD48 em células endodérmicas.

Figura 65- Fotomicrografia de microscopia confocal do saco vitelino de embrião ovino de idade gestacional exata de 15 dias.

6.3 CULTIVO CELULAR

Esta seção abrange os protocolos utilizados para isolamento e expansão celular, bem como os ensaios funcionais de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose das células cultivadas em suspensão e, formação de vasos rudimentares *in vitro* e *in vivo* das células aderentes do saco vitelino.

6.3.1 Isolamento das células derivadas do saco vitelino

As células provenientes do saco vitelino de embriões ovinos de diferentes idades gestacionais foram extraídas por diversos tipos de maceração, contadas em câmara de Neubauer (Quadro 3) e cultivadas em diferentes meios de cultura.

Método	Total de células
Mecânica + Enzimática	$4,85 \times 10^5$
Mecânica + Enzimática	$1,115 \times 10^6$
Mecânica + Enzimática	$7,8 \times 10^5$
Mecânica	$3,3 \times 10^5$
Mecânica	$1,95 \times 10^5$
Mecânica	$8,75 \times 10^5$

Quadro 3 - Contagem total de células obtidas das membranas vitelinas após diferentes tipos de maceração no primeiro cultivo realizado

Inicialmente as células colocadas em cultivo apresentaram grande quantidade de células não aderentes e pequena quantidade de células de característica aderente (Figura 66). Após 48 horas as porções celulares aderentes e em suspensão foram separadas e cultivadas em meios específicos.

Pode-se observar que as células cultivadas em suspensão por 3, 6 e 9 dias apresentavam morfologia esférica e refringente. Além disso, com 3 dias de cultivo algumas células formaram agrupamentos em cachos (Figura 67) que são similares às conformações adquiridas *in vitro* por células hematopoéticas.

As células vitelinas aderentes apresentaram, aos 3 e 6 dias de cultivo, morfologia poligonal achatada, e com o decorrer do cultivo (D+9) as células adquiriram morfologia fibroblastóide (Figura 68). Em um cultivo estas células agruparam-se em colônias que eram formadas por células aderentes e células não aderentes na superfície, além de apresentarem intercomunicações entre elas (Figura 69).

Legenda: Em ambas imagens evidencia-se a grande quantidade de células não aderentes sobre uma porção aderente obtidas a partir do cultivo da população celular total isolada da membrana vitelina.

Figura 66- Fotomicrografias das células totais do saco vitelino após 2 dias em cultivo

Legenda: Observar em A grande quantidade de células em suspensão obtida da população celular total cultivada. Em B observa-se em maior aumento pequenos aglomerados de células em suspensão (setas), as quais apresentam morfologia esférica e acentuada refringência.

Figura 67- Fotomicrografias das células do saco vitelino cultivadas em suspensão

Legenda: A e B, células aderentes de pequeno formato obtidas da membrana vitelina, após 2 dias em cultivo. Em C e D, células com morfologia fibroblastoide após 9 dias em cultivo.

Figura 68- Fotomicrografias das células aderentes do saco vitelino

Legenda: Conformação em colônias blásticas adquiridas pelas células vitelinas aderentes após primeira tripsinização. Observar em B e C característica aderente das colônias e presença de células não aderentes e refringentes na região central das mesmas. Observar em D intercomunicação apresentada pelos agrupamentos celulares.

Figura 69- Fotomicrografias das células aderentes do saco vitelino

6.3.2 Ensaio de potencial de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose

No primeiro cultivo realizado, utilizou-se $3,3 \times 10^5$ de células maceradas mecanicamente e $4,85 \times 10^5$ de células maceradas mecânica e enzimaticamente para realizar o ensaio de potencial de formação de colônias.

No dia seguinte ao plaqueamento das células foi notada a formação de colônias isoladas que eram morfológicamente heterogêneas, indicando que a cultura das células do saco vitelino possuía vários tipos celulares. Foram observados agrupamentos de células com morfologia fibroblastóide e achatadas, similares morfológicamente às células mesenquimais (Figura 70-B). Outro agrupamento celular observado possuía característica endotelial, com células de menor tamanho (Figura 70-B). A colônia do terceiro tipo celular visualizado, provavelmente o mais primitivo, era formada por células compactadas em seu interior e característica fibroblastóide externamente (Figura 70-A), lembrando um tipo de colônia de células embrionárias em cultivo.

Legenda: Em A observar colônia formada por células compactadas em seu interior e por células fibroblastóides na periferia. Em B agrupamento celular esperso com morfologia fibroblastóide e achatada (setas), e colônia de pequenas células refringentes com morfologia poligonal.

Figura 70- Fotomicrografias das células do saco vitelino no ensaio de metilcelulose D+1

6.3.3 Ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares *in vitro*

Utilizou-se a quantidade celular de 1×10^5 para realizar o ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares *in vitro*.

Após 48h foi possível observar a conformação segmentar das CTSV, que se apresentavam aderidas entre si, mas suspensas no meio, diferentemente da invasão matricial esperada para o tipo celular endotelial sob tais estímulos.

As CTSV+HUVEC apresentaram formação de colônias quando cultivadas conjuntamente e as células controle HUVEC cultivadas individualmente apresentaram formação de vasos rudimentares invadidos na matriz do matrigel (Figura 71).

Legenda: Em A observar formação de colônias no matrigel. Em B agrupamentos celulares enfileirados.

Figura 71- Fotomicrografias das células do saco vitelino no ensaio de formação de vasos rudimentares *in vitro*

6.3.4 Ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares *in vivo*

Utilizou-se a quantidade celular de 1×10^6 para realizar o ensaio de potencial de formação de vasos rudimentares *in vitro*.

Após 15 dias, as células do saco vitelino quando infundidas unicamente na presença de matrigel apresentaram conformações enfileiradas, mas também não apresentaram tubos vasculogênicos rudimentares. No entanto, foi observada a presença de microvasos no interior dos plugs de matrigel das células do saco vitelino (Figuras 72 e 73). As células endoteliais humanas HUVEC, que foram infundidas apenas na presença de matrigel, não apresentaram capacidade de formação de vasos (Figuras 74 e 75). No grupo que recebeu as células do saco vitelino em conjunto com as células endoteliais humanas (HUVEC) houve formação rudimentar de vasos (Figuras 76 e 77).

Legenda: A, matrigel (seta) localizado em dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com células de saco vitelino ovino. B, fotomicrografia de microscopia confocal das células do saco vitelino apresentando conformação enfileirada (traços pontilhados).

Figura 72 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células do saco vitelino ovino.

Legenda: A, matrigel (seta) localizado em dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com células de saco vitelino ovino. Notar presença de vascularização no interior do matrigel (*). B, fotomicrografia de microscopia confocal das células do saco vitelino apresentando enfileiramento das mesas.

Figura 73 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células do saco vitelino ovino.

Legenda: A, matrigel (seta) localizado em dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com HUVEC humana. B, fotomicrografia de microscopia confocal das células endoteliais umbilicais humanas apresentando marcação positiva para CD31 humano.

Figura 74 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano.

Legenda: A, matrigel (seta) localizado em dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com HUVEC humana. B, fotomicrografia de microscopia confocal das células endoteliais umbilicais humanas apresentando marcação positiva para CD31 humano.

Figura 75 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano.

Legenda: A, matrigel (seta) localizado em dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com HUVEC humana e células do saco vitelino ovino. B, fotomicrografia de microscopia confocal das células endoteliais umbilicais humanas apresentando marcação positiva para CD31 humano.

Figura 76 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano e das células do saco vitelino ovino.

Legenda: A, matrigel (seta) imerso em PBS após ser extraído do dorso do camundongo NOD/SCID, infundido com HUVEC humana e células do saco vitelino ovino. B, fotomicrografia de microscopia confocal das células endoteliais umbilicais humanas apresentando enfileiramentos e marcação positiva para CD31 humano.

Figura 77 - Ensaio angiogênico *in vivo* das células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano e das células do saco vitelino ovino.

6.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS VITELINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As análises dos marcadores de superfície das células vitelinas aderentes, por citometria de fluxo, indicaram níveis consideráveis de CD44 (78.55 ± 0.95), baixos níveis dos marcadores de células hematopoéticas CD45 (2.175 ± 0.74), CD14 (4.55 ± 2.09), CD41/CD61 (6.24 ± 2.26), CD38 (6.265 ± 2.18), CD48 (9.24 ± 5.91) e do marcador de células endoteliais CD31 (4.27 ± 0.79) (Figura 78, Tabela 3).

Legenda: Histogramas indicando marcações de superfície por citometria de fluxo.

Figura 78 - Imunofenotipagem das células vitelinas aderentes por citometria de fluxo.

Tabela 3- Média e desvio padrão da marcação por citometria de fluxo das células vitelinas aderentes

	E1	E4	Média	Desvio Padrão
CD31	4.83	3.71	4.27	0.791959595
CD44	77.68	79.03	78.355	0.954594155
CD45	2.7	1.65	2.175	0.74246212
CD41/CD61	7.84	4.64	6.24	2.2627417
CD14	6.03	3.07	4.55	2.093036072
CD38	7.81	4.72	6.265	2.184959954
CD48	13.42	5.06	9.24	5.911412691

As análises dos marcadores de superfície das células vitelinas não aderentes, por citometria de fluxo, indicaram baixos níveis de CD44 ($1.17 \pm 1,07$), baixos níveis dos marcadores de células hematopoéticas CD45 ($1.67 \pm 1,92$), CD14 ($2.53 \pm 3,03$), CD41/CD61 ($0.85 \pm 0,64$), CD38 ($3.28 \pm 3,93$), CD48 ($1.25 \pm 0,11$) e do marcador de células endoteliais CD31 ($0.76 \pm 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4- Média e desvio padrão da marcação por citometria de fluxo das células vitelinas não aderentes

	SVE1	SVE2	SVE3	Média	Desvio Padrão
CD31	0.81	0.76	0.7	0.75667	0.055075705
CD44	2.4	0.6	0.51	1.17	1.066161339
CD45	3.89	0.6	0.53	1.67333	1.920008681
CD41/CD61	1.3	0,9	0.4	0.85	0.636396103
CD14	6.03	0.78	0.78	2.53	3.031088913
CD38	7.81	1.28	0.76	3.28333	3.928820858
CD48	1.35	1.13	1.26	1.24667	0.1106044

6.5 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

Esta seção abrange os resultados moleculares obtidos a partir das análises de expressão gênica, seguidos das análises de eletroforese para examinação da qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas para as reações de PCR em tempo real.

6.5.1 Análise da integridade das amostras de RNA total

As amostras de RNA total obtidas das membranas vitelinas (D+0) de diferentes idades gestacionais foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise de sua integridade. Na Figura 79, pode-se observar as subunidades 28S e 18S de RNAr, mostrando a integridade e a qualidade da preparação, bem como observa-se as subunidades de RNAt (4S) junto com RNAr (5S).

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o fracionamento das amostras de RNA total extraído das membranas vitelinas.

Figura 79- Fracionamento das amostras de RNA total extraído das membranas vitelinas de diferentes idades embrionárias

As amostras de RNA total obtidas das células vitelinas cultivadas (D+3, D+6 e D+9) de diferentes idades gestacionais foram submetidas à eletroforese capilar para análise de integridade. Observa-se as subunidades 28S e 18S de RNAr, mostrando a integridade e a qualidade da preparação, bem como as subunidades de RNAt (4S) junto com RNAr (5S) (Figura 80).

Legenda: Eletroforese microfluídica mostrando o fracionamento das amostras de RNA total extraído das células vitelinas cultivadas.

Figura 80- Fracionamento das amostras de RNA total extraído das células vitelinas cultivadas de diferentes idades embrionárias

6.5.2 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

As análises de expressão gênica referem-se a Dia 0 (D+0), o qual membranas de diferentes idades embrionárias foram dissecadas e submetidas à extração de RNA sem serem submetidas a qualquer tipo de cultivo celular, e, Dia 3, 6 e 9 (D+3, D+6 e D+9), nos quais células vitelinas cultivadas foram submetidas a extração de RNA em dias determinados de cultivo.

6.5.2.1 Dia 0

Para a expressão gênica D+0 foram analisadas membranas vitelinas extraídas de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento.

A análise de expressão dos diversos genes amplificados nas diferentes amostras de saco vitelino D+0 mostrou que o gene Anexina-5 estava altamente expresso (2831,6 URE) em todas as idades embrionárias, principalmente na idade de 24 dias. Os genes SCF (1352,5 URE) e LMO (1327,5 URE) apresentavam uma expressão aumentada nas idades de 24 e 25 dias. Além destes, o gene FLK-1 mostrou um perfil de expressão aumentado na idade de 24

dias (1958,1 URE) e novamente na idade de 32 dias (1903,2 URE). Semelhantemente, o gene GATA-3 apresentou-se altamente expresso nas idades de 24 (2005,5 URE) e 28 dias (706,8 URE) e o gene VEGF mostrou alta expressão nas idades de 24 (1057,3 URE) e 27 dias (867,5 URE). Outros genes como o RUNX-1 (409,7 URE), TAL-1 (153,3 URE), CD41 (149,0 URE), ALDH (12,9 URE) e CD150 (5,7 URE) apresentaram índices de expressão constantes, porém baixos em todas as idades quando comparados com o total de genes amplificados (Gráfico 1).

Legenda: Análise de genes expressos por PCR em Tempo Real da membrana vitelina D+0.

Gráfico 1- Análise de expressão gênica da membrana vitelina D+0 de diferentes idades embrionárias

6.5.2.2 Dia 3, 6 e 9

A análise de expressão gênica das células não aderentes do saco vitelino após 3 dias de cultivo mostrou uma alta expressão dos genes Flk-1 (4176,9 URE), Anexina-5 (2783,6 URE), CD41 (2783,6 URE) e do gene LMO (2777,8 URE). Estas células apresentaram também significativa expressão do gene Tal-1 (857,6 URE) e níveis baixos dos genes SCF (80,7 URE), Gata-3 (21,8 URE) e ALDH (21,4 URE).

O perfil de expressão apresentou-se modificado entre os tipos celulares analisados. As células cultivadas em aderência após 6 dias expressaram altos níveis dos genes Anexina-5 (6466,2 URE), SCF (509,2 URE), Flk-1 (436,8 URE), CD41 (341,4 URE), e baixos níveis dos genes Gata-3 (45,0 URE), LMO (28,3 URE), ALDH (15,5 URE) e Tal-1 (9,5 URE) em todas as amostras D+6 e D+9 quando comparados com o total de genes amplificados (Gráfico 2).

Legenda: Análise de genes expressos por PCR em Tempo Real das células vitelinas cultivadas D+3, D+6 e D+9.

Gráfico 2- Análise de expressão gênica das células vitelinas de diferentes idades embrionárias cultivadas D+3, D+6 e D+9

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário marca o início da gestação em ovinos. Nesta espécie, o período embrionário estende-se da fecundação até 35 dias de gestação (BRYDEN; EVANS; BINNS, 1972; EVANS E SACK, 1973; MELLOR E MATHESON, 1979). Durante este período ocorre um rápido crescimento e diferenciação celular, onde tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características morfológicas externas do corpo embrionário são reconhecidas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O aparecimento das estruturas iniciais determinará, ainda neste período, a sustentação imediata do embrião, a qual afetará o desenvolvimento adequado da placenta e do futuro feto (ALBERTO, 2006).

O início do desenvolvimento placentário em ovinos ocorre antes da “implantação” definitiva do ovo fecundado, e a morfogênese placentária durante a gestação inicial está intimamente relacionada às membranas extra-embrionárias, diferenciadas em cório, alantóide, âmnio e saco vitelino (KING et al., 1982; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Dada a importância das membranas placentárias, destaca-se no presente trabalho o saco vitelino, das quais é a única membrana anexa ao embrião presente em todas as espécies vivíparas e ovíparas de vertebrados (MOSSMAN, 1987; NODEN; DE LAHUNTA, 1990).

A formação do saco vitelino ocorre no início da embriogênese, no momento em que o hipoblasto sofre deslocamento e dá origem à cavidade da blástula. A cavidade do saco vitelino é então forrada pelo endoderma (MOSSMAN, 1987) e ao longo da parte interna da membrana exocelômica ocorre uma migração de células adicionais produzidas pelo hipoblasto. Estas células proliferam e formam gradualmente uma nova cavidade dentro da cavidade exocelômica, denominada saco vitelino secundário ou saco vitelino definitivo (SADLER, 2005), o qual é composto por células de duas camadas germinativas: endoderma e mesoderma (PEREDA, MONGE; NIIMI, 2010; DIETERLEN-LIÈVRE; CORBEL; SALAÜN, 2010). De acordo com Wrobel e Suess (1968) o saco vitelino se desenvolve de um disco trilaminar para um corpo cilíndrico. Mossman (1937) coloca ainda que o saco vitelino, assim como o cório, é derivado do ectoderma embrionário, discriminando mais uma camada de origem para o mesmo.

Neste estudo, optou-se por avaliar e descrever macroscopicamente o embrião da ovelha em suas diferentes fases gestacionais estimadas para melhor interpretar as fases celulares que os embriões possivelmente se encontrariam e obter melhor entendimento geral das características do saco vitelino e da placenta, aliado a fase embriológica investigada.

Este estudo foi iniciado então com embriões ovinos aos 15 dias de gestação (CR 4,1mm), os quais se apresentam envoltos pela membrana amniótica, com presença do pedículo embrionário, membrana corioalantóide vascularizada, saco vitelino partindo da porção ventral, saliência cardíaca, estomodeu, encéfalo anterior, somitos, cauda, região dos arcos branquiais, neuróporo cranil em fechamento, região de fígado e local de formação da crista mesonéfrica. A partir do 18º dia de gestação (CR 5,8mm) o embrião possui cordão umbilical e evidência do broto do membro torácico. Aos 19 e 21 dias de desenvolvimento (CR 6,4mm e 7,7mm), o embrião apresenta-se imerso em líquido amniótico e aos 22 dias (CR 8,0mm e 8,7mm), 23 (CR 10,2mm) e 24 (CR 11,3mm), a medula espinal está presente. Observa-se curvatura cervical, membro torácico e membro pélvico com extremidades em forma de pá, e olhos com pigmentação de retina. No período entre 25 (CR 13,4mm e 13,3mm), 26 (CR 14,1), 27 (CR 16,1mm), 28 (CR 16,99) e 29 (CR 17,8mm) os membros apresentam bipartição para formação dos cascos, diferenciação da porção rostral, formação de focinho e cavidade oral. Aos 30 (CR 18,08), 31 (CR 19,65) e 32 dias de gestação (CR 22mm), o embrião ovino prepara-se para o período fetal, apresentando costelas, região de quarto ventrículo formada, vascularização da derme e formação da orelha externa, corroborando com as características descritas por Evans e Sack (1973).

As análises macroscópicas indicaram ainda, que a membrana vitelina ovina apresenta-se completamente formada, grande, avascular e localizada ventralmente ao embrião aos 15 dias de desenvolvimento. Esta característica modifica-se a partir dos 18 dias, a qual passa a apresentar menor tamanho e presença de vascularização, contradizendo Latshaw (1987), o qual afirma que em ruminantes o saco vitelino, independente da fase de desenvolvimento, é grande, vascular e completamente cercado pela cavidade extra-embriônica.

Além disso, o saco vitelino ovino, com o decorrer do desenvolvimento embrionário, modifica sua posição anatômica de inserção. Primeiramente o saco vitelino situa-se na região ventral do embrião em formação, onde mantém, segundo Pereda et al. (1997); Pereda e Motta (1999) e Mançaneres (2007), uma conexão com o intestino primitivo proveniente do intestino posterior. Porém, com a deslocação do pedículo embrionário para o estabelecimento do cordão umbilical, o saco vitelino justapõe-se ao âmnio e é externalizado da região ventral do embrião para a região medial do cordão umbilical, diferentemente do relatado por Latshaw (1987); Russe et al. (1992) e Assis Neto (2005) para embriões bovinos, os quais afirmaram que o mesmo se solta do cório e se reduz a uma estrutura sólida na forma de um cordão a partir dos 20 dias, e após os 70 dias torna-se vestigial e desaparece.

Nestas espécies, portanto, o saco vitelino é funcional durante um curto período de tempo (NODEN; DE LAHUNTA, 1990). Porém, suas funções nesta fase são muito importantes, destacando-se dentre elas absorção e digestão de nutrientes maternos, síntese de proteínas (GALDOS-RIVEROS, 2010), formação da circulação vitelina e secreção intravascular de nutrientes (LATSHAW, 1987; BARON, 2003), além de algumas funções exercidas pelo fígado, antes que o fígado fetal se desenvolva (GULBIS et al., 1998).

Esta membrana possui definida ainda uma função primitiva, talvez a principal, de formar CTP, capazes de originar as células sanguíneas, bem como o tecido das veias, artérias e capilares (BEIGUELMAN, 2000; CHO et al., 2006). Isto ocorre através de uma célula precursora de ambas linhagens hematopoética e endotelial denominada hemangioblasto (SABIN, 1920; MURRAY, 1932; WAGNER, 1980; Li; WEI; WAGNER, 1999; JAFFREDO et al., 2005).

Um adendo cabível de discussão refere-se a contradição da literatura em descrever a potencialidade das células-tronco do saco vitelino como pluripotenciais (BEIGUELMAN, 2000; CHO et al., 2006), enquanto apenas as células-tronco embrionárias, as quais são extraídas da massa celular interna do blastocisto é que podem ser consideradas pluripotentes (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004; LINHENG; LI; TING XIE, 2005). Após este estágio as células possuem uma potencialidade mais limitada, uma multipotencialidade. Além disso, as células vitelinas apesar de serem extraídas de estágios iniciais de desenvolvimento embrionário são consideradas células-tronco adultas (ZAGO; COVAS, 2006; PESSOLATO et al., 2010).

O hemangioblasto é, portanto, multipotente. No entanto, a capacidade de diferenciação deste é ainda amplamente questionada. Forrai e Robb (2003) propuseram que o hemangioblasto, no saco vitelino, possui capacidade de diferenciar-se em CTH primitivas, CTH definitivas e células endoteliais. Este mesmo tipo celular, no entanto, ao surgir na região da esplancnopleura paraórtica ou região AGM tem a capacidade de diferenciar-se em endotélio hemogênico, o qual se diferencia em células endoteliais e CTH definitivas. Bailey e Fleming (2003) acreditam que o hemangioblasto embrionário tenha potencial de diferenciar-se em CTH definitivas e em angioblastos, mas não possua capacidade de auto-renovação. Os angioblastos teriam uma provável capacidade de se auto-renovarem e de originar células precursoras endoteliais, ao passo que as CTH possuiriam comprovada capacidade de auto-renovação, diferenciação em todas as linhagens sanguíneas, além de originarem células endoteliais. Lancrin et al. (2010) propuseram recentemente que o hemangioblasto (Flk-1⁺,

Brachyury⁺) tem origem mesodermal (Brachyury⁺) proveniente do epiblasto e sob estímulos de fatores de transcrição (Scl) e vias de sinalização controladoras da hematopoese, possui capacidade de originar células de músculo liso vascular (Tie2⁺, SMA⁺, Kit⁻, VE-caderina⁻, CD41⁻), endotélio (Flk-1⁺, Brachyury⁻, Tie2⁺, Kit⁺, VE-caderina⁺, CD41⁻) e endotélio hemogênico (Flk-1⁺, Brachyury⁻, Tie2⁺, Kit⁺, VE-caderina⁺, CD41⁻). Este último, por sua vez, é que possui a capacidade de diferenciar-se em progenitores eritróides primitivos (tie2^{low/-}, Kit^{+/-}, CD41⁺) e em progenitores hematopoéticos definitivos (tie2^{low/-}, Kit^{+/-}, CD41⁺, CD45⁺).

Alguns conceitos e teorias referentes à existência do hemangioblasto sugerem que os mesmos surjam primeiramente no saco vitelino, na região mesenquimal do mesmo originando as “ilhas sanguíneas”. Segundo Sadler (2005) e Zago e Covas (2006), os hemangioblastos centrais formam as primeiras células-tronco hematopoéticas, enquanto os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores endoteliais. Observações do saco vitelino realizadas em microscópio óptico indicaram que aos 15 dias de idade gestacional estimada, na região mesenquimal, existe grande quantidade de ilhas sanguíneas em toda a extensão da membrana, porém com pouca quantidade de células sanguíneas primitivas no interior. As ilhas sanguíneas observadas nas idades de 21 a 23 dias, ao contrário do encontrado no período anterior, mostraram-se cheias e com grande quantidade de células sanguíneas primitivas circundadas por células endoteliais. Nas análises realizadas em embrião de 25 dias as ilhas sanguíneas apresentaram uma fusão entre si e grande quantidade de células sanguíneas. Corroborando aos nossos achados, essa íntima associação de desenvolvimento das linhagens hematopoéticas e endoteliais na região das ilhas sanguíneas confirmam provável hipótese de que ambas linhagens são originadas deste precursor comum denominado hemangioblasto (WAGNER, 1980; CHOI et al., 1998; UENO; WEISSMAN, 2006; YOSHIMOTO; YODER, 2009).

A membrana vitelina analisada em MEV apresentou dados semelhantes aos encontrados na microscopia óptica. As ilhas sanguíneas apresentam-se como elevações globosas na superfície da membrana quando analisada por este tipo de microscopia. Essas elevações são visíveis dos 25 aos 29 dias. Porém, com o decorrer do desenvolvimento embrionário essas ilhas sanguíneas agrupam-se e fundem-se umas às outras, formando tubos endoteliais (SADLER, 2005). A superfície da membrana apresenta cavidades e vasos sanguíneos com células sendo liberadas na luz dos vasos, células sanguíneas liberadas no interior da membrana, além de uma grande quantidade de partículas e células liberadas por toda a superfície externa da membrana, assim como observado por Pereda, Monge e Niimi

(2010) no saco vitelino humano em seus diversos trabalhos (PEREDA; CERISOLA; POZO, 1988; PEREDA; MOTTA, 1999; PEREDA, 2001; PEREDA; NIIMI, 2008; PEREDA; GIANFRANCO; NIIMI, 2009; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010), os quais propõem que antes da circulação saco vitelino-embrião estar estabelecida transportando células sanguíneas primitivas ao embrião através dos vasos vitelinos, uma transferência de material e de células sanguíneas maduras ao embrião são produzidas através do ducto vitelino. Além disso, Pereda, Monge e Niimi (2010) descreveram também que essas cavidades vistas em toda a superfície da membrana vitelina são uma continuidade do orifício luminal das vesículas endodérmicas, as quais suprem a demanda celular sanguínea do embrião a partir do estabelecimento da circulação.

À microscopia eletrônica de transmissão, de maneira geral, a membrana vitelina apresenta camada simples de epitélio formando a região endodérmica, com células de formato cúbico e prismático, citoplasma claro e escuro, assim como descrito em bovinos (RUSSE et al., 1992), possuindo grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, grande quantidade de mitocôndrias, desmossomos, núcleo com cromatina condensada e em grande parte, presença de mais de um nucléolo, evidenciando uma grande atividade proliferativa e de síntese por parte destas células (SHANDLEY; ALCORN; WINTOUR, 1997; ALBERTS et al., 2008). A membrana apresenta também região mesenquimal vascular (MANÇANARES, 2007; DIETERLEN-LIÈVRE; CORBEL; SALAÜN, 2010), com presença de ilhas sanguíneas formadas de células endoteliais circundando células sanguíneas nucleadas no interior. Tais células sanguíneas apresentam grande quantidade de mitocôndrias, núcleos com cromatina condensada e nucléolos. Abaixo da região mesenquimal encontra-se a região mesotelial, formada por uma camada simples de endotélio, o qual apresenta microvilos em sua superfície, assim como descrito por Pereda, Monge e Niimi (2010), e vesículas de secreção na região citoplasmática, sugerindo alta atividade secretora por estas células (ALBERTS et al., 2008).

Pereda, Monge e Niimi (2010) observaram na MET a presença de espaços arredondados localizados na região endodérmica da membrana vitelina humana, os quais os denominaram de vesículas endodérmicas. Estas vesículas, em seus achados, abrigavam eritrócitos maduros no interior. Interessantemente, verificamos também a presença de tais vesículas, porém ao contrário do descrito pelo grupo citado, possuíam eritrócitos primitivos localizadas no lúmen das mesmas. De qualquer forma, nossos achados confirmam os relatos de tais autores, uma vez que sugerem a possibilidade do surgimento sanguíneo no saco

vitelino ocorrer não apenas da região mesodérmica da membrana, mas ser oriundo também da camada germinativa endodermal (PEREDA; NIIMI, 2008).

Ainda em relação a esta hipótese, observamos em microscopia confocal, marcações pelos anticorpos CD31 (marcador de células progenitoras endoteliais) e CD41 (marcador de células eritróides primitivas e progenitoras hematopoéticas maduras) em células endodérmicas da membrana vitelina, e não em células endoteliais e hematopoéticas, as quais se localizam na região mesenquimal desta membrana, como se esperava. Tal fato reforça ainda mais a possível teoria do surgimento sanguíneo ocorrer também em uma camada outra, que não a mesodérmica (PEREDA; NIIMI, 2008; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010).

Além das análises microscópicas, foi possível identificar no cultivo celular do saco vitelino a presença de células com característica hematopoética e células aderentes com morfologia endotelial. Pontualmente, foi possível observar também em alguns cultivos colônias de células aderentes que apresentavam células não aderentes na superfície das mesmas, sugerindo novamente a possibilidade da existência do hemangioblasto nesta população isolada, além de corroborar com a teoria que propõe que o hemangioblasto tem a capacidade de gerar células-tronco hematopoéticas através de um estágio de endotélio hemogênico (LANCRIN et al., 2009). No entanto, tal teoria surgiu de estudos de Choi et al. (1998), os quais através de um ensaio de formação de colônias blásticas (BL-CFC), a partir de células-tronco embrionárias em estágio de formação de corpos embrióides *in vitro*, encontraram colônias celulares com característica aderente com células não aderentes sendo originadas na superfície das mesmas. Isso foi possível em condições e estímulos específicos em cultura, ao passo que tal característica surgiu de maneira espontânea nas células vitelinas do presente trabalho.

Entretanto, as células vitelinas aderentes cultivadas apresentaram morfologia endotelial nos primeiros dias de cultivo e em longo prazo apresentaram alteração morfológica para fibroblastóide alongada, morfologia esta típica de células mesenquimais. Além da morfologia, dados da citometria de fluxo indicaram uma baixa expressão de marcadores hematopoéticos e de células endoteliais CD31 (4.27 ± 0.79), sugerindo talvez uma rápida diferenciação destas células a um comprometimento mesodérmico, apesar de Wenceslau (2009) não obter diferenciação adipocítica das células mesenquimais vitelinas de cão.

O conceito do hemangioblasto ganhou mais sustentação a partir da observação de que as células das linhagens endoteliais e hematopoéticas compartilhavam a expressão de um número de diferentes genes (FINA et al., 1990; MILLAUER et al., 1993; YAMAGUCHI et

al., 1993; ANAGNOSTOU et al., 1994; KALLIANPUR et al., 1994; YOUNG et al., 1995; ASAHARA et al., 1997; KABRUN et al., 1997).

A análise de expressão dos diversos genes amplificados nas amostras de saco vitelino (dia 0) de diferentes idades embrionárias estimadas mostrou uma alta expressão do gene FLK-1 (um gene receptor do VEGF), gene este essencialmente expresso pelo hemangioblasto assim como descrito por Millauer et al. (1993); Kabrun et al. (1997); Forrai e Robb (2003); Bertrand e Traver (2009) e Lancrin et al. (2009). A expressão deste gene manteve-se alta em todas as idades embrionárias utilizadas, porém mostrou-se altamente expresso entre as idades de 24d e 27d, sendo provavelmente requerido para o desenvolvimento das ilhas sanguíneas (MANDRIOTA; MENOUD; PEPPER, 1996). Tal dado foi importante para inferirmos que o período provavelmente ativo do hemangioblasto em originar células-tronco hematopoéticas e progenitoras endoteliais não ocorre em fases embrionárias muito iniciais, pois no embrião de 23 dias analisado tal gene foi mais expresso, porém não apresentou expressão proporcionalmente maior como observada nas idades supracitadas.

Outros genes altamente expressos em todas as amostras foram o SCF e LMO cuja expressão é característica de células-tronco e progenitoras hematopoéticas (NCBI - *Protein*). Na idade embrionária estimada de 32d, houve uma alteração no perfil de expressão do gene SCF, na qual se apresenta superexpresso, sugerindo um comprometimento hematopoético mais avançado neste período embrionário, corroborando com o descrito por Fennie et al. (1995).

Lancrin et al. (2009) geraram CTH através de colônias celulares CD41+ associadas a outros marcadores, inferindo ser este gene essencial para a indução diferencial primária das CTH a partir do hemangioblasto.

O gene GATA-3 também está envolvido com a formação e estabelecimento das ilhas sanguíneas, além de ser um marcador específico do hemangioblasto (YOKOMIZO et al., 2007). Nas análises de expressão gênica D+0 encontramos uma alta expressão deste gene principalmente nas idades de 24 e 28 dias.

Os genes CD44 e VEGF apresentaram um padrão de expressão contínuo, porém com níveis baixos em todas as idades utilizadas. Esses genes são característicos de estágios mais maduros de linfopoese e vasculogênese. Tal expressão corrobora com a primitividade desta população celular, e sugere que provavelmente o perfil hematopoético primário estava sendo estabelecido *in vivo* na idade embrionária de 32d.

No desenvolvimento do embrião de camundongo o fator de transcrição Runx-1 é requerido para a formação de CTH e suas progenitoras (YOSHIMOTO; YODER, 2009). De fato, o Runx-1 foi considerado necessário para a emergência de clusters de CTH no endotélio hemogênico (YOKOMIZO et al., 2001). Chen et al. (2009) mostraram que dentro do endotélio, a expressão de Runx-1 é essencial para a formação de CTH e progenitoras por um período de aproximadamente 3 dias, durante o desenvolvimento do embrião de camundongo de 8.25 a 11.5 dias. Apesar da expressão do Runx-1 não ter sido consideravelmente alta em todas as idades estudadas, houve um pico de expressão nas idades de 23d para 24d e de 27d para 28d. Este pico de expressão nas idades mais iniciais de desenvolvimento deve-se ao fato de que provavelmente tal gene estava sendo ativado para a formação dos nichos hematopoéticos na membrana. A expressão aumentada nas idades mais tardias, provavelmente ocorreu devido à necessidade de formação e maturação das CTH neste órgão.

Além da necessidade do Runx-1 para a emergência de clusters de CTH, Bollerot, Pouget e Jaffredo (2005) relataram que o gene Tal-1 específico de células hematopoéticas, o qual apresentou alta expressão em todas as idades embrionárias é também expresso pelo hemangioblasto em um estágio secundário de diferenciação, como os encontrados na região da AGM (YAO et al., 2007).

Os genes Anexina-5 e ALDH foram selecionados por serem expressos por células-tronco. O ALDH é um receptor de membrana presente apenas em células primitivas. Assim, apenas células com a membrana celular intacta é que possui este receptor, o qual tem a capacidade de expulsar corantes aldeídos (STORMS et al., 1999), quando estimulados em ensaios específicos de *side population*. No entanto, este marcador não apresentou alta expressão nas idades estudadas. Provavelmente, nestas idades já havia um maior comprometimento da população celular total engajada na hematopoese embrionária inicial e apenas uma pequena população celular ainda apresentava este receptor.

Por outro lado, a Anexina-5 foi o gene mais superexpresso em todas as idades embrionárias. Interessantemente, este gene além de expresso por células-tronco, é responsável pela ativação apoptótica celular (ANAZETTI; MELO, 2007). Neste caso, podemos inferir que o saco vitelino nesta espécie, por ser transitório, já apresenta mecanismos de ativação apoptótica desde idades iniciais enquanto ele está ainda ativo, conforme encontramos em dados de microscopias óptica, eletrônica de transmissão, eletrônica de varredura e expressão gênica de todas as idades analisadas.

A partir deste perfil de superexpressão, podemos sugerir outra função ainda não descrita do saco vitelino: como anticoagulante placentário (BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993; LAAT et al., 2007), pois pode manter a homeostase dos tecidos placentários com papel funcional de maturação e não descolamento da placenta (GALDOS-RIVEROS, 2009), o que poderia levar a um aborto ainda no período embrionário.

Semelhante ao encontrado no perfil de expressão gênica D+0, na análise de expressão gênica das células vitelinas cultivadas em suspensão pode-se destacar a superexpressão do gene FLK-1 expresso pelo hemangioblasto (MILLAUER et al., 1993; KABRUN et al., 1997; FORRAI; ROBB, 2003; BERTRAND; TRAVER, 2009; LANCRIN et al., 2009) condizendo com a possível não aderência do hemangioblasto (ABONOUR et al., 1998; BAILEY; FLEMING, 2003). Além deste, a alta expressão do gene CD41 relacionado a estágios iniciais de hematopoese e essencial para a indução diferencial primária das CTH a partir do hemangioblasto (LANCRIN et al., 2009), e a alta expressão do gene LMO expresso por células-tronco e progenitoras hematopoéticas (NCBI – *Protein*), sugere que o cultivo provavelmente possuía uma população celular mista de células mais acometidas com uma hematopoese mais avançada neste período embrionário (FENNIE et al., 1995).

Apesar de as células aderentes terem apresentado morfologia endotelial em períodos iniciais em cultura, os altos níveis de expressão de genes essencialmente expressos por CTH, como os genes SCF e FLK-1 (FENNIE et al., 1995; KIRCHSTEIN; SKIRBOLL, 2001; NG et al., 2004; NARDI; ALFONSO, 2006; BITTENCOURT; ROCHA, 2006; MCKINNEY-FREEMAN et al., 2009; TÁRNOK; ULRICH; BOCSI, 2010) e progenitoras endoteliais (WATT, 1995; ASAHARA et al., 1997; PEICHEV et al., 2000; REYES et al., 2001; DEB; PATTERSON, 2010), após 6 dias de cultivo, indicam uma grande primitividade destas células e que provavelmente o cultivo não tenha influenciado a *stemness* desta população celular precursora primitiva presente na membrana vitelina.

Repetidamente ao encontrado nas análises de expressão gênica (D+0), a superexpressão do gene Anexina-5 caracteriza a possível existência de mecanismos autoapoptóticos (ANAZETTI; MELO, 2007) no saco vitelino desde fases muito iniciais de formação do mesmo, independente da idade embrionária estudada. Além disso, a superexpressão deste gene pode reforçar a possível e inovadora função ainda não descrita do saco vitelino como anticoagulante placentário (BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993; LAAT et al., 2007).

Além disso, é sabido que além do uso de CPE há uma tendência para a utilização de CTH geneticamente modificadas para o tratamento de doenças não mortais, como a hemofilia A. Para tanto, esforços estão sendo feitos no intuito de refinar protocolos de transdução para expressão do FVIII a partir de CTH para o tratamento da hemofilia A e o uso de células hematopoéticas geneticamente geradas a partir de células iPS como tratamento para distúrbios da hematopoese (DOERING; ARCHER; TRENT SPENCER, 2010).

Assim, a compreensão detalhada do processo de hematopoese e vasculogênese vitelina caracterizada neste trabalho, possibilita o desenvolvimento de terapias para diversos tipos de doenças a partir da identificação dos tipos celulares precursores ou diferenciados e de seu estágio de desenvolvimento. Neste sentido, como é descrito que as células-tronco do saco vitelino não expressam antígenos do MHC e por isso possuem capacidade de escapar à rejeição imunológica, as mesmas podem ser utilizadas como uma população de células doadoras para receptores halogênicos e xenogênicos (ESKOLA, 1977).

Uma vez fornecida uma ampla caracterização de tais células neste trabalho, o saco vitelino apresenta-se como uma fonte interessante de células-tronco relevante para Terapia Celular. É necessário, no entanto, que maiores estudos focados em uma manipulação genética melhorada das CTH e das CPE oriundas deste órgão sejam realizados, no intuito de comprovar o comportamento destas *in vivo*, aumentar a segurança global de transferência gênica, bem como focar na otimização de ensaios pré-clínicos e clínicos de resultados confiáveis.

8 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

- Na macroscopia o saco vitelino aos 15 dias está localizado ao ventre embrionário, aos 18 dias já apresenta vascularização e com o desenvolvimento embrionário o saco vitelino justapõe-se ao âmnio ao ser externalizado para região medial do cordão umbilical, e aos 32 dias o mesmo enovela-se para entrar em regressão.

- Na microscopia óptica as ilhas sanguíneas surgem na região mesenquimal do saco vitelino a partir dos 15 dias e aos 19 dias possuem grande quantidade de eritrócitos primitivos no interior. Com o decorrer do desenvolvimento da vasculogênese essas ilhas se fundem e formam tubos endoteliais, os futuros vasos sanguíneos.

- Na microscopia eletrônica de varredura, a liberação celular do saco vitelino condiz com a teoria de que o suprimento sanguíneo ocorre mesmo antes do estabelecimento da circulação embrionária, através do ducto vitelino. Porém, estudos focados na interação saco vitelino - ducto vitelino - embrião necessitam de maiores esclarecimentos na espécie ovina para melhor elucidar esta afirmação.

- Na microscopia eletrônica de transmissão, a presença de vesículas localizadas na região endodérmica da membrana possuindo células sanguíneas no interior, e as marcações de nichos celulares na endoderme por marcadores hematopoéticos observados na microscopia confocal sugerem que, provavelmente e inovadoramente, a origem sanguínea embrionária seja proveniente também da camada germinativa endodérmica. No entanto, estudos específicos ainda necessitam ser realizados, a fim de melhor esclarecer tais mecanismos.

- No cultivo celular, a proporção de células aderentes e não aderentes é independente da idade embrionária cultivada. Marcadamente, a população celular vitelina possui características peculiares e curiosas, principalmente em relação à formação de colônias aderentes com capacidade de originar células não aderentes de maneira espontânea. Dúvidas ainda permanecem, como por exemplo, a capacidade de adesão ou não adesão do hemangioblasto. Ressalta-se contudo, a necessidade de estudos com o intuito de isolamento por *sorting* citométrico a partir de alguns marcadores deste tipo celular com “atividade hemangioblástica”, além de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* que visem provar esse bipotencial do mesmo.

- Na expressão gênica, a população celular total da membrana vitelina D+0 e as duas porções celulares aderente e não aderente cultivada (D+3, D+6 e D+9) confirmam a presença de células com este perfil ao expressarem genes específicos do hemangioblasto e de células-tronco ou até mesmo de células precursoras. Ressaltamos, no entanto, a necessidade de uma caracterização mais aprofundada das duas porções celulares de embriões de diferentes idades em diferentes dias de cultivo, a fim de melhor elucidar o real perfil hemangioblástico/hematopoético estabelecido *in vivo* ou induzido *in vitro*.

O saco vitelino apresenta interessantes informações, tanto do ponto de vista morfológico como molecular. O estudo deste é de fundamental importância para se compreender este anexo embrionário primitivo gerador de um sistema hematopoético inicial, ressaltada a misteriosa relação funcional deste órgão com o embrião em formação. Além disso, o saco vitelino pode ser um modelo experimental para o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa relacionadas às células-tronco, proteômica e terapia utilizando células para o tratamento de diversas doenças, assim como a hemofilia A descrita neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABONOUR, R.; SCOTT, K. M.; KUNKEL, L. A.; ROBERTSON, M. J.; HROMAS, R.; GRAVES, V.; LAZARIDIS, E. N.; CRIPE, L.; GHARPURE, V.; TRAYCOFF, C. M.; MILLS, B.; SROUR, E. F.; CORNETTA, K. Autologous transplantation of mobilized peripheral blood CD34+ cells selected by immunomagnetic procedures in patients with multiple myeloma (Bone Marrow Transplantation). **Basingstoke**, v.22, n.10, p.957-963, 1998.
- ALBESIANO, E.; MESSMER, B. T.; DAMLE, R. N.; ALLEN, S. L.; RAI, K. R.; CHIORAZZI, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v.102, n.9, p.3333-3339, 2003.
- ALBERTO, M. L. V. **Estudo de desenvolvimento do aparelho respiratório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ALISON, M. R.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; DHILLON, A. P.; JACOB, J.; NOVELLI, M. ; PRENTICE, G.; WILLIAMSON, J.; WRIGHT, N. A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v. 406, n. 6793, p. 257, 2000.
- ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia celular**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 1, p. 2-14.
- ANAGNOSTOU, A.; LIU, Z.; STEINER, M.; Chin, K.; Lee, E. S.; Kessimian, N.; Noguchi C. T. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 3974-3978, 1994.
- ANTUNES, S.V. Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. **Haemophilia**, v. 8, p. 199-202, 2002.
- ARMITAGE, S.; HARGREAVES, R.; SAMSON, D.; BRENNAN, M.; KANFER, E.; NAVARRETE, C. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. **Bone Marrow Transplantation**, v. 20, n. 7, p. 587-591, 1997.
- ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.
- ASSIS NETO, A. C. **Avaliação morfológica da placentação em bovinos de**

gestações normais e de gestações manipuladas em laboratórios. 2005. 220 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**, v. 14, n. 3, p. 269-280, 1996.

BADIAVAS, E.V.; ABEDI, M.; BUTMARC, J.; FALANGA, V.; QUESENBERRY, P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, n. 2, p. 245-250, 2003.

BAILEY, A. S.; FLEMING, W. H. Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 987-993, 2003.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada.** 2. ed. Rio de Janeiro: Manole, 1992. 629 p.

BARON, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 12, p. 1160-1169, 2003.

BARONE, R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. In: BARONE, R. **Splanchnologie.** Paris: Vigot Frères, 1976. v. 2, p. 579-605.

BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JUNIOR, A. P. Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 385-393, 1993.

BASAK, G. W.; YASUKAWA, S.; ALFARO, A.; HALLIGAN, S.; SRIVASTAVA, A. S.; MIN, W-P.; MINEV, B.; CARRIER, E. Human embryonic stem cells hemangioblast express HLA-antigens. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 27, 10 p., 2009.

BEIGUELMAN, B. O estudo dos gêmeos. 2000. Disponível em: <<http://www.descirtual.com/bbeiguel/GEMESOS.PRN.pdf>, 99p 2000>. Acesso em: 15/12/2010.

BERNTORP, E. The treatment of haemophilia, including prophylaxis, constant infusion and DDAVP. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 9, n. 2, p. 259-271. 1996. Review.

BERTRAND, J. Y.; TRAVER, D. Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, p. 243-248, 2009.

BITTENCOURT, H.; ROCHA, V. A célula-tronco hematopoética e seu uso clínico. In: **Células-Tronco a Nova Fronteira da Medicina.** Atheneu: São Paulo, 2006. p. 115-130.

BOLLEROT, K.; POUGET, C.; JAFFREDO, T. The embryonic origins of hematopoietic stem cells: a tale of hemangioblast and hemogenic endothelium. **Journal Compilation**, v. 113, p. 790-803, 2005.

BRYDEN, M. M.; EVANS, H. E.; BINNS, W. Embryology of the sheep. I. Extraembryonic membranes and the development of body form. **Journal of Morphology**, v. 138, n. 2, v. 169-186, 1972.

BROXMEYER, H. E.; HANGOC, G.; COOPER, S.; RIBEIRO, R. C.; GRAVES, V.; YODER, M.; WAGNER, J.; VADHAN-RAJ, S.; BENNINGER, L.; RUBINSTEIN, P. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 9, p. 4109-4113, 1992.

BROXMEYER, H. E.; DOUGLAS, G. W.; HANGOC, G.; COOPER, S.; BARD, J.; ENGLISH, D.; ARNY, M.; THOMAS, L.; BOYSE, E. A. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 10, p. 3828-3832, 1989.

BURGIO, G. R.; GLUCKMAN, E.; LOCATELLI, F. Ethical reappraisal of 15 years of cord-blood transplantation. **Lancet**, v. 361, n. 9353, p. 250-252, 2003.

CARR, J. H.; RODAK, B. F. **Atlas de hematologia clínica**. Santos: São Paulo, 2000. p. 217.

CHO, F. N.; CHEN, S.; TAI, M. H.; YAN, T. L. The quality and size of yolk sac in early pregnancy loss. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 46, p. 413-418, 2006.

CHOI, K.; KENNEDY, M.; KAZAROV, A.; PAPADIMITRIOU, J. C.; KELLER, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. **Development**, v. 125, p. 725-732, 1998.

CUMANO, A.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; GODIN, I. **Cell**, v.86, p.907-916, 1996.

CUMANO, A.; GODIN, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Immunology**, v.13, n. 2, p. 166-171, 2001.

CUMANO, A.; FERRAZ, J. C.; KLAINE, M.; DI SANTO, J. P.; GODIN, I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. **Immunity**, v. 15, n.3, p. 477-485, 2001.

DEB, A.; PATTERSON, C. Hard Luck Stories: The Reality of Endothelial Progenitor Cells Continues to Fall Short of the Promise. **Circulation**, v. 121, p. 850-852, 2010.

DELASSUS, S.; CUMANO, A. Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. **Immunity**, v. 4, p. 97-106, 1996.

DIETERLEN-LIÈVRE, F.; CORBEL, C.; SALAÜN, J. Allantois and placenta as developmental sources of hematopoietic stem cells. **International Journal of Developmental Biology**, v.54, p. 1079-1087, 2010.

DZIERZAK, E.; MEDVINSKY, A. The discovery of a source of adult hematopoietic cells in the embryo. **Development**, v. 135, n. 14, p. 2343-2346, 2008.

- DZIERZAK, E.; OOSTENDORP, R. **Hematopoietic stem cell development in mammals**. In: ZON, L. Hematopoiesis: a developmental Approach. New York: Oxford University Press, 2001. p. 209-217.
- EILKEN, H. M.; NISHIKAWA, S. I.; SCHROEDER, T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. **Nature**, v. 457, p. 896-901, 2009.
- ESKOLA, J. Cell transplantation into immunodeficient chicken embryos. Reconstituting capacity of cells from the yolk sac at different stages of development and from the liver, thymus, bursa of Fabricius, spleen and bone marrow of 15-day embryos. **Immunology**, v. 32, n. 4, p. 467-74, 1977.
- EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.
- EWING, P.; WILKE, A.; BROCKHOFF, G.; ANDREESSEN, R.; EISSNER, G.; HOLLER, E.; GERBITZ, A. Isolation and transplantation of allogeneic pulmonary endothelium derived from GFP transgenic mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, p. 307-315, 2003.
- FENNIE, C.; CHENG, J.; DOWBENKO, D.; YOUNG, P.; LASKY, L. A. CD 34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD 34+ hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 86, n. 12, p. 4454-4467, 1995.
- FERRARI, G.; CUSELLA-DE, A. G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.
- FINA, L.; MOLGAARD, H. V.; ROBERTSON, D.; BRADLEY, N. J.; MONAGHAN, P.; DELIA, D.; SUTHERLAND, D. R.; BAKER, M. A.; GEAVES, M. F. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood**, v. 75, p. 2417-2426, 1990.
- FORRAI, A.; ROBB, L. The Hemangioblast, between blood and vessels. **Cell Cycle**, v. 2, n. 2, p. 86-90, 2003.
- FORRESTER, L. M.; BERNSTEIN, A.; ROSSANT, J.; NAGY, A. Long-term reconstitution of the mouse hematopoietic system by embryonic stem cell-derived fetal liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 17, p. 7514-7517, 1991.
- FRANCEY, T.; SCHALCH, L.; BRCIC, M.; PETERHANS, E.; JUNGI, T. W. Generation and functional characterization of ovine bone marrow-derived macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 32, p. 281-301, 1992.
- GALDOS-RIVEROS, A. C. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária**. 2. ed. Varela: São Paulo, 2005. p. 206.

GASPER, P. W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, I. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Williams & Wilkins: Philadelphia, 2000. cap.11, p.63-68.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada**. 2. ed. Roca: São Paulo, 1998. p. 107-137.

GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. A.; AUERBACH, A. D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G. W.; DEVERGIE, A.; ESPEROU, H.; THIERRY, D.; SOCIE, G.; LEHN, P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.

GODKIN, J. D.; LIFSEY, B. J.; BAUMBAUCH, G. A. Characterization of protein production by bovine chorionic and allantoic membranes. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 195-204, 1988.

GODIN, I.; DIETERLEN-LIÈVRE, F.; CUMANO, A. Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. **Developmental Biology**, v. 92, p. 773-777, 1995.

GODIN, I.; CUMANO, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 593-604, 2002.

GRAPIN-BOTTON, A. Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, p. 335-347, 2005.

GRIESE, D. P.; EHSAN, A.; MELO, L. G.; KONG, D.; ZHANG, L.; MANN, M. J.; PRATT, R. E.; MULLIGAN, R. C.; DZAU, V. J. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. **Circulation**, v. 108, p. 2710-2715, 2003.

GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, p. 857-862, 1998.

HAAR, J. L.; ACKERMAN, G. A. Phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. **Anatomic Record**, v. 170, p. 199-224, 1971.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. [S.l]: Manole, 2004. 513 p.

HEINIGER, J.; KISSLING-ALBRECHT, L.; NEUENSCHWANDER, S.; ROSLI, R.; PLISKA, V. Antihaemophilic effect of vasopressin, deamino- (D-arginine8)- vasopressin and adrenaline in sheep: proposal for an in vivo assay system. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 279-281, 1988.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

- HOLLESTELLE, M. J.; THINNES, T.; CRAINK STIKO, A.; KRUIJT, J. K.; VAN BERKEL, T. J.; LOSKUTOFF, D. J.; VAN MOURIK, J. A. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo - a closer look. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, p. 855-861, 2001.
- HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; FITZPATRICK, L. A.; KOO, W. W.; GORDON, P.L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J.C.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v. 5, p. 309-315, 1999.
- HUANG, H.; AUERBACH, R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 10110-10114, 1993.
- IANUS, A.; HOLZ, G. G.; THEISE, N. D.; HUSSAIN, M. A. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.6, p. 843-850, 2003.
- IKUTA, K.; UCHIDA, N.; FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I. L. Lymphocyte development from stem cells. **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 759-783, 1992.
- JAFFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D.; GAUTIER, R.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, p. 269-277, 2005.
- JAIN, N. M. Erythrocyte physiology and changes in disease. In: JAIN, N. M. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.133-159.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.487.
- KABRUN, N.; BUHRING, H. J.; CHOI, K.; ULLRICH, A.; RISAU, W.; KELLER, G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. **Development**, v. 124, p. 2039-2048, 1997.
- KALE, S.; KARIHALOO, A.; CLARK, P. R.; KASHGARIAN, M.; KRAUSE, D. S.; CANTLEY, L. G. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischaemically injured renal tubule. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 42-49, 2003.
- KALLIANPUR, A. R.; JORDAN, J. E.; BRANDT, S. J. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both haematopoietic and vascular system during embryogenesis. **Blood**, v. 83, p. 1200-1208, 1994.
- KELLY, S. J.; WOOD, W. G.; WANG, C. In vitro growth of sheep erythroid progenitors. **Brazilian Journal Haematology**, v. 64, p. 757-765, 1986.
- KESSINGER, A.; SHARP, J. G. Mobilization of blood stem cells. **Journal Stem cells**, v. 16, p. 139-143, 1998.

KHURANA, S.; MUKHOPADHYAY, A. In vitro transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells: An alternative source of engraftable hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 49, p. 998-1007, 2008.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertilization**, v. 59, n. 31, p. 17-30, 1982.

KING, B.; ENDERS, A. Protein absorption and transport by the guinea pig visceral yolk sac placenta. **American Journal Anatomy**, v. 129, p. 261-288, 1970.

KIRCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. **Stem cells**: scientific progress and future research directions. Washington, D.C.: National Institute of Health. Department of Health and Human Services, 2001. 106 p.

KOBAYASHI, N.; MIYAZAKI, M.; FUKAYA, K.; INOUE, Y.; SAKAGUCHI, M.; UEMURA, T.; NOGUCHI, H.; KONDO, A.; TANAKA, N.; NAMBA, M. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. **Transplantation**, v. 69, p. 202-207, 2000.

KUMARAN, V.; BENTEN, D.; FOLLENZI, A.; JOSEPH, B.; SARKAR, R.; GUPTA, S. Transplantation of endothelial cells corrects the phenotype in hemophilia A mice. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 2022-2031, 2005.

LAAT, B.; WU, X. X.; LUMMEL, M. V.; LUMMEL, M. V.; DERKSEN, R. H. W. M.; GROOT, P. G.; RAND, J. H. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of β 2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. **Blood Journal**, v. 109, p. 1490-1494, 2007.

LACAUD, G.; ROBERTSON, S.; PALIS, J.; KENNEDY, M.; KELLER, G. Regulation of Hemangioblast Development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.938, n.1, p. 96-107, 2001.

LANCRIN, C.; SROCZYNSKA, P.; STEPHENSON, C.; ALLEN, T.; SOUSKOFF, V.; LACAUD, G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. Letters. **Nature**, v.457, n.7231, p.892-895, 2009.

LANCRIN, C.; SROCZYNSKA, P.; SERRANO, A. G.; GANDILLET, A.; FERRERAS, C.; KOUSKOFF, V.; LACAUD, G. Blood cell generation from the hemangioblast. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, p. 167-172, 2010.

LANSDORP, P. M. Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. **Journal of Experimental Hematology**, v. 23, n. 3, p. 187-191, 1995.

LARSEN J. F.; KNOTH, M. Ultrastructure of the anchoring villi and trophoblastic shell in the second week of placentation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 50, n. 2, p. 117-128, 1971.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy**: a clinical oriented approach. Toronto: Decker, 1987. p. 49-74.

LEE, C. A. Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 516-524, 1999.

LI, J.; WEI, Y.; WAGNER, T. E. In vitro endothelial differentiation of long-term cultured murine embryonic yolk sac cells induced by matrigel. **Stem Cells**, v. 17, p. 72-81, 1999.

LIN, K. C.; HSU, S. C.; KUO, C. H.; ZHOU, J. Y. Difference of plasma leptin levels in venous and arterial cord blood: relation to neonatal and placental weight. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 12, p. 679-685, 1999.

LIN, Y.; CHANG, L.; SOLOVEY, A.; HEALEY, J. F.; LOLLAR, P.; HEBBEL, R. P. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. **Blood**, v. 99, p. 457-462, 2002.

LUGUS, J. J.; PARK, C.; CHOI, K. Developmental relationship between hematopoietic and endothelial cells. **Immunologic Research**, v.32, n. 1-3, p. 57-74, 2005.

LYONS A. S.; PETRUCCELLI, R. J. **Medicine: an illustrated history**. New York: Ed. Harry N. Abrams Inc., 1987.

MANCO-JOHNSON, M. J.; NUSS, R.; GERAGHTY, S.; FUNK, S.; KILCOYNE, R. Results of secondary prophylaxis in children with severe hemophilia. **American Journal of Hematology**, v. 47, p. 113-117, 1994.

MANDRIOTA, S. J.; MENOUD, P. A.; PEPPER, M. S. Transforming Growth Factor beta1 Down-regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2/flk-1 Expression in Vascular Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 11500-11505, 1996.

MANSO, V. M. C.; NUNES, L. T.; NUNES L.; PINTO, M. C. M.; OLIVEIRA, M. A.; BARJA, P. R. **Panorama histórico e distribuição da hemofilia no Brasil**. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

MARCICANO, G.; SHEHU, D.; GALLI, C. Factors controlling haemopoiesis in ovine long-term bone marrow cultures. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 291-301, 1997.

MAYANI, H.; LANSDORP, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Journal Stem Cells**, v. 16, n.3, p. 153-165, 1998.

MC GRATH, K.; PALIS, J. Hematopoiesis in yolk sac: more than meets the eye. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1021-1028, 2005.

MCKINNEY-FREEMAN, S. L.; NAVEIRAS, O.; YATES, F.; LOEWER, S.; PHILITAS, M.; CURRAN, M.; PARK, P. J.; DALEY, G. Q. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 268-78, 2009.

- MEDVINSKY, A.; TAOUDI, S.; MENDES, S.; DZIERZAK, E. Analysis and manipulation of hematopoietic progenitor and stem cells from murine embryonic tissues. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, 2008. DOI: 10.1002/9780470151808. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470151808>>. Acesso em: 15/12/2010.
- MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R. A.; MCKERCHER, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 4, n. 290, p. 1779-1782, 2000.
- MIKKOLA, H. K. A.; GEKAS, C.; ORKIN, S. H.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1048-1054, 2005.
- MILLAUER, B.; WIZIGMANN-VOOS, S.; SCHNURCH, H.; MARTINEZ, R.; MOLLER, N. P.; RISAU, W.; ULLRICH, A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. **Cell**, v. 72, p. 835-846, 1993.
- MOORE, M. A.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Brazilian Journal of Haematology**, v.18, p.279-2, 1970.
- MOORE, M. A. S.; OWEN, J. J. T. Stem cell migration in developing myeloid and lymphoid systems. **Lancet**, v. 2, p. 658-659, 1967.
- MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. 383 p
- MULLER, A. M.; MEDVINSKY, A.; STROUBOULIS, J.; GROSVELD, F.; DZIERZAK, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. **Immunity**, v. 1, p. 291-301, 1994.
- MURRAY, P. D. F. The development in vitro of the blood of the early chick embryo. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 11, n.773, p. 497-521, 1932.
- NARDI, N. B.; ALFONSO, Z. C. Células-tronco hematopoéticas. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da Medicina**. Atheneu: São Paulo, 2006. p.49-65.
- NG, Y. Y.; KESSEL, B. V.; LOKHORST, H. M.; BAERT, M. R. M.; BURG, C. M. M. V. D.; BLOEM, A. C.; STAAL, F. J. T. Gene-expression profiling of CD34- cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p.314-323, 2004.
- NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. 1. ed. Acibria: Zaragoza, 1990. 339 p.
- PALIS, J.; ROBERTSON, S.; KENNEDY, M.; WALL, C.; KELLER, G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. **Development**, v. 126, p. 5073-5084, 1999.

PALIS, J.; CHAN, R. J.; KONISKI, A.; PATEL, R.; STARR, M.; YODER, M. C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 4528–4533, 2001.

PALIS, J.; YODER, M. Y. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 927-936, 2001.

PANEPUCCI, R. A.; CALADO, R. T.; ROCHA, V.; PROTO-SIQUEIRA, R.; SILVA, W. A.; ZAGO, M. A. Higher expression of transcription targets and components of the nuclear factor- κ B pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood CD34⁺ precursors. **Stem Cells, Genetics and Genomics**, v.25, n. 1, p. 189-196, 2007.

PARDANAUD, L., ALTMANN, C.; KITOS, P.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; BUCK, C. A. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. **Development**, v. 100, p. 339-349, 1987.

PEICHEV, M.; NAIYER, A. J.; PEREIRA, D.; ZHU, Z.; LANE, W. J.; WILLIAMS, M.; OZ, M. C.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A. S.; RAFII, S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**, v. 95, n.3, p. 952-958, 2000.

PEREDA, J.; CERISOLA, H.; POZO, J. El saco vitelino humano: superficies endodérmica y mesotelial analizadas por microscopia electronica de barrido. **Annual Anatomical Normal**, v.6, n. 6, p.90-92, 1988.

PEREDA, J.; MOTTA, P.M. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. **Medical Electron Microscopy**, v. 32, p. 67-78, 1999.

PEREDA, J. Significado morfofuncional del saco vitelino durante el periodo embrionario humano: revisión del problema e impacto en Clínica. **Contribuciones Científicas y Tecnológicas**, Area Ciencias Medicas, n.128, 24p., 2001.

PEREDA, J.; NIIMI, G. Embryonic Erythropoiesis in Human Yolk Sac: two different compartments for two different processes. **Microscopy Research and Technique**, v.00, p.000-000, 2008.

PEREDA, J.; GIANFRANCO, F. ; NIIMI, G. The vital role of yolk sac in the survival of the human embryo: facts, evidences and open questions. **Cell and Tissue Biology Research**, v.1, n.1, p.1-14, 2009.

PEREDA, J.; MONGE, J. I.; NIIMI, G. Two different pathways for the transport of primitive and definitive blood cells from the yolk sac to the embryo in humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 00, p.000–000, 2010.

PEREZ-SIMON, J. A.; CABALLERO, M. D.; CORRAL, M.; NIETO, M. J.; ORFAO, A.; VAZQUEZ, L.; AMIGO, M. L.; BERGES, C.; GONZALEZ, M.; DEL CANIZO, C.; SAN MIGUEL, J. F. Minimal number of circulating CD34⁺ cells to ensure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. **Journal Transfusion**, v. 38, n. 4, p. 385-391, 1998.

- PESSOLATO, A. G. T.; FERREIRA, P. C. G.; JACOB, T. R.; TRISTAO, W. Células-tronco adultas e aplicações na terapia celular. Ribeirão Preto: Casa da Ciência de Ribeirão Preto, 2010. **Folhetim**.
- REBEL, V. I.; MILLER, C. L.; EAVES, C. J.; LANSDORP, P. M. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. **Blood**, v. 87, p. 3500-3507, 1996.
- REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P. H.; VERFAILLIER, C. M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 337-346, 2002.
- REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and ex vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, p. 2615-2625, 2001.
- RISAU, W.; SARIOLA, H.; ZERWES, H. G.; SASSE, J.; EKBLOM, P.; KEMLER, R.; DOETSCHMAN, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, v. 102, n. 3, p. 471-478, 1988.
- ROBB, L.; LYONS, I.; LI, R.; HARTLEY, L.; KONTGEN, F.; HARVEY, R. P.; METCALF, D.; ANDBEGLEY, C. G. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.15, p.7075-7079, 1995.
- ROBB, L.; ELEFANTY, A. G. The hemangioblast-an elusive cell captured in culture. **BioEssays**, v. 20, p. 611-614, 1998.
- ROHEN, J. W.; DRECOLL, E. L. **Embriologia funcional**. O desenvolvimento dos sistemas funcionais do organismo humano. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 147 p.
- ROSSI-FERREIRA, R.; DEFFUNE, E.; THOMAZINI-SANTOS, I.; MACHADO, P. E. A. Obtenção e caracterização de anticorpo monoclonal murino anti-fator VIII da coagulação sanguínea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 97-104, 2006.
- RUGH, R. Chronology of development (8-16 days). In: RUGH, R. **The mouse: reproduction and development**, Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1968. p.102-207.
- RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; CHALLENGER, E. Die Entwicklung des Dottersackes beim Wiederkäuer (Schaf und Rind). **Anatomy Histology Embryology**, v. 21, p. 324-347, 1992.
- SABIN, F. R. Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. **Contributions to Embryology**, v. 9, p. 213-262, 1920.
- SADLER, T. W. **Langman embriologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- SCHOTS, R.; VAN RIET, I.; DAMIAENS, S.; FLAMENT, J.; LACOR, P.; STAELENS, Y.; STEENSSSENS, L.; VAN CAMP, B.; DE WAELE, M. The absolute number of circulating

CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. **Journal Bone Marrow Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 509-515, 1996.

SHANDLEY, L.; ALCORN, D.; WINTOUR, M. Ovine Amniotic and Allantoic Epithelia Across Gestation. **The Anatomical Record**, v. 248, p. 542-553, 1997.

SHIVDASANI, R.A., MAYER, E.L., AND ORKIN, S.H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. **Nature**, v.373, n.6513, p.432-434, 1995.

SLADE, B. S. An attempt to visualize protein transmission across the rabbit visceral yolk sac. **Journal Anatomy**, v. 107, p. 531-545, 1970.

SIENA, S.; BREGNI, M.; BRANDO, B.; RAVAGNANI, F.; BONADONNA, G.; GIANNI, A. M. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose. **Blood**, v. 74, n. 6, p. 1905-1914, 1989.

TAM, P. P. L.; LOEBEL, D. A. F. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. **Nature**, v. 8, p. 368-381, 2007.

TÁRNOK, A.; ULRICH, H.; BOCSI, J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. **Cytometry Part A**, v. 77A, p.6-10, 2010.

THEISE, N. D.; HENEGARIU, O.; GROVE, J.; JAGIRDAR, J.; KAO, P. N.; CRAWFORD, J. M.; BADVE, S.; SAXENA, R.; KRAUSE, D. S. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Journal Experimental Hematology**, v. 30, n. 11, p.1333-1338, 2002.

THOMAS, T.; SOUTHWELL, B. R.; SCHREIBER G.; JAWORROWSKI, A. Plasma protein síntesis and secretion in the visceral yolk sac of the fetal rat: gene expresión, protein síntesis and secretion. **Placenta**, v. 11, p. 413-430, 1990.

TIEDMANN, K. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. **Anatomy Embryology**, v. 158, p. 75-94, 1979.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Research**, v. 14, p. 213-22, 1961.

UENO, H.; WEISSMAN, I.L. The origin and fate of yolk sac hematopoiesis: application of chimera analyses to developmental studies. **International Journal of Developmental Biology**, v.54, p.1019-1031, 2010.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Journal Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

ZAGO, M. A. Injeções de vida: clonagem e terapia celular. **Revista Pesquisa FAPESP**, n. 73, p. 2-4, 2002.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006. 264 p.

WAGNER, R. C. Endothelial cell embryology and growth. **Advances in Microcirculation**, v. 9, p. 45-75, 1980.

WANG, R.; CLARK, R.; BAUTCH, V. L. Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. **Development**, v. 114, p. 303-16, 1992.

WATT, S.; GSCHMEISSNER, S.; BATES, P. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 17, p. 229-235, 1995.

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WILPSHAAR, J.; BHATIA, M.; KANHAI, H.H.H.; BREESE, R.; HEILMAN, D.K.; JOHNSON, C. S.; FALKENBURG, J. H. F.; SROUR, E. F. Engraftment potential of human fetal hematopoietic cells in NOD/SCID mice is not restricted to mitotically quiescent cells. **Blood**, v.100, n.1, p.120-127, 2002.

WION, K. L.; KELLY, D.; SUMMERFIELD, J. A.; TUDDENHAM, E. G. D.; LAWN, R. M. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. **Nature**, v. 317, p. 726-729, 1985.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed., v. 3, London: Chapman and Hall, 1994. p. 233-429.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2006. Vancouver, Canada. [S.l]: WFH, [2006].

WROBEL, K. H.; SUESS, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy Embryology**, v. 197, p. 451-467, 1998.

YAMAGUCHI, J. P.; ROSSANT, J. Fibroblast growth factor in mammalian development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 485-491, 1995.

YODER, M. C.; HIATT, K.; DUTT, P.; MUKHERJEE, P.; BODINE, D. M.; ORLIC, D. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. **Immunity**, v.7, p.335-344, 1997.

YOKOMIZO, T.; TAKAHASHI, S.; MOCHIZUKI, N.; KUROHA, T.; EMA, M.; WAKAMATSU, A.; SHIMIZU, R.; OHNEDA, O.; OSATO, M.; OKADA, H.; KOMORI, T.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.I.; ITO, Y.; YAMAMOTO, M. Characterization of GATA-1⁺ hemangioblastic cells in the mouse embryo. **The EMBO Journal**, v.26, p.184-196, 2007.

YOSHIMOTO, M.; YODER, M. C. Developmental biology: birth of the blood cell. **Nature**, v.457, n.12, p.801-803, 2009.

YOUNG, P. E.; BAUMHUETER, S.; LASKY, L. A. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. **Blood**, v. 85, p. 96-105, 1995.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v.425, p.836-841, 2003.

APÊNDICE

DIFICULDADES ENCONTRADAS

Para o desenvolvimento e execução do projeto foram encontradas algumas dificuldades relacionadas, principalmente, ao modelo utilizado. Dentre estes se podem citar:

- Genoma ovino não caracterizado completamente (por isso o desenho de alguns primers teve que ser baseado no genoma bovino).
- Número de anticorpos com reação específica limitados.
- Apenas um abatedouro no estado de São Paulo (Marfrig Alimentos) e, por isso a incerteza da possibilidade de coleta e da quantidade de embriões compatíveis com as fases necessárias.

Para superar a dificuldade de aquisição das amostras foi realizado um contato na fazenda Dorper Campo Verde, onde são realizadas inseminações e transferência de embriões em ovelhas receptoras de descarte. No entanto, em fases iniciais (necessárias e importantes para o desenvolvimento do projeto) os profissionais não eram capacitados para detectar prenhez por ultrassom, dificultando ainda mais a disponibilidade de amostras necessárias para a padronização de cultivo celular e análises comparativas de ultraestrutura, cultivo e expressão gênica de diferentes idades embrionárias.

- Além das dificuldades referentes ao modelo utilizado, destaca-se também grande dificuldade de padronização do cultivo celular, pois as células apresentaram considerável contaminação logo nos primeiros dias de cultivo, provavelmente devido às condições patológicas das ovelhas que são abatidas, na maioria das vezes, justamente por serem animais de descarte, e também pela importante exposição e contato do útero ao conteúdo das vísceras no momento do abate.

Esta dificuldade foi superada no último trimestre de 2010, com uma colaboração feita com o Departamento de Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista Prof. Julio Mesquita Filho (UNESP) campus Jaboticabal. Nesta colaboração foi realizado um protocolo de sincronização do cio de ovelhas, com posterior cobertura por monta natural. As fases gestacionais foram acompanhadas por ultrassom desde os dias iniciais seguidos da cobertura, o que possibilitou a certeza de coleta de embriões com idade de desenvolvimento exata e otimizou o cultivo celular ao eliminar a questão da contaminação dos úteros por líquidos fecais.

- Outra dificuldade encontrada após o estabelecimento do cultivo sem contaminação foi o baixo rendimento de RNA, das células cultivadas aderentes e em suspensão D+3, D+6 e D+9. Para melhorar esta condição, foi feita a aquisição de um kit de extração de RNA para amostras com pequenas quantidades de células e mesmo assim o rendimento foi tão baixo que não foi possível a realização do cDNA das amostras extraídas. Na tentativa ainda de superar esta dificuldade, utilizou-se um carreador de RNA para aumentar o rendimento do mesmo, mas a pureza da amostra ficou prejudicada e a quantidade de eluição deste kit era insuficiente para a realização do cDNA. Foram feitos alguns testes utilizando o volume total de RNA conseguido na extração para a realização do cDNA e posterior reação de PCR em tempo real, porém o Cycle Threshold (Ct), o qual indica o ciclo de início da amplificação, do gene endógeno utilizado (GAPDH) estava muito alto (acima de 29). Tal fato deixava a análise da real expressão duvidosa, pois ou este gene endógeno não é expresso por tais células ou as amostras de RNA estavam tão impuras que se degradaram. Novamente, para superar tal condição utilizamos o aparelho Bioanalyser Pico Kit, que utiliza uma quantidade amostral em picogramas para a realização da reação de eletroforese capilar. Através dos resultados destas reações pudemos utilizar apenas as amostras íntegras e com isso, afirmar fielmente os perfis de expressão gênica estabelecidos em cultivo. Após isso, realizamos o desenho de mais um primer de gene endógeno (β -actina) e prosseguimos com as reações de PCR em tempo real de diferentes idades, em diferentes tempos de cultura para finalmente descartarmos todas as possibilidades errôneas de análises dos perfis de expressão nos dados preparados para publicação em revista científica (dados das reações de PCR em tempo real do gene da β -actina não estão sendo mostrados na dissertação).