ANDRÉ LUIS REZENDE FRANCIOLLI

**Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*,
Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental
análogo murino para detecção de linhagens “Germ Cells”**

São Paulo

2007

ANDRÉ LUIS REZENDE FRANCIOLLI

**Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*,
Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo
murino para detecção de linhagens “Germ Cells”**

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

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1919
FMVZ

Francioli, André Luis Rezende

Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens "Germ Cells" / André Luis Rezende Francioli. – São Paulo: A. L. R. Francioli, 2007.
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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. Célula-tronco germinativa. 2. Fetos. 3. Imunohistoquímica. 4. Pacas. 5. Placentação. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	99f	96f
Resumo	1	3	---f	96f
Abstract	1	3	---f	96f

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Embriologia em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens *Germ Cells*", protocolado sob o nº1143/2007, utilizando 08 (oito) pacas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Embryology in paca (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): establishment of an experimental model murine analogous for Germ Cells lineage detection", protocol number 1143/2007, utilizing 08 (eight) paca, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
Renováveis

**CADASTRO TÉCNICO FEDERAL
CERTIFICADO DE REGULARIDADE**

Nr. de Cadastro:	CPE/CNPJ:	Emitido em:	Válido até:
570888	108.067.528-07	10/08/2007	10/11/2007

Nome/Razão Social/Endereço

Ana Flávia de Carvalho
Rua Joaquim de Paula Cruz 767
Jardim Santa Úrsula
AGUAI/SP
13860-000

Este certificado comprova a regularidade no

Cadastro de Atividades Potencialmente Poluidoras

Uso de Recursos Naturais / criador com fins científicos de fauna silvestre nativa e exótica

Observações:

- 1 - Este certificado não habilita o interessado ao exercício da(s) atividade(s) descrita(s), sendo necessário, conforme o caso, de obtenção de licença, permissão ou autorização específica após análise técnica do IBAMA, do programa ou projeto correspondente;
- 2 - No caso de encerramento de qualquer atividade especificada neste certificado, o interessado deverá comunicar ao IBAMA, obrigatoriamente, no prazo de 30 (trinta) dias, a ocorrência para atualização do sistema;
- 3 - Este certificado não substitui a necessária licença ambiental emitida pelo órgão competente;
- 4 - Este certificado não habilita o transporte de produtos ou subprodutos florestais e faunísticos;

A inclusão de Pessoas Físicas e Jurídicas no Cadastro Técnico Federal não implicará por parte do IBAMA e permite terceiros, em certificação de qualidade, sem ônus de valor de qualquer espécie.

Autenticação

b5tz.61p7.xl9v.7a75

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FRANCIOLLI, André Luis Rezende

Título: Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens “Germ Cells”

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: _____

Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatuta: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Eliana Maria Rezende de Faria Franciulli** e
meu pai **Marcílio Rovilson Franciulli**,

Foi com vocês que aprendi tudo que sei da vida, desde meus primeiros passos até o que sou hoje, além de tudo, aprendi a respeitar as pessoas, seus espaços, suas limitações, suas impaciências, suas alegrias e tristezas. Vocês sempre me apoiaram nas minhas escolhas e sempre estiveram do meu lado. Muito obrigado por tudo, pois sem vocês não teria chegado até aqui. Amo vocês.

À minha irmã **Adrielle**,

pelo apoio durante a dissertação. Amo você.

À meu filho **Pedro**,

que desde sua vida intra-uterina aprendi a amá-lo, pois a partir desde dia, todas minhas vitórias serão dedicadas a você. Te amo.

“A família é a base da sociedade e o lugar onde as pessoas aprendem pela primeira vez os valores que os guiarão durante toda a vida”

João Paulo II

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
pela oportunidade de realização deste curso de Pós-graduação.

À FAPESP

pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

pela oportunidade de ingressar na carreira científica, pelos ensinamentos compartilhados, pela convivência, pela confiança e por acreditar em mim na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

pelas orientações, pela paciência, pela disponibilidade, pelo incentivo à carreira de pesquisador e acima de tudo pela grande amizade sempre presente.

A Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho

pelos ensinamentos vividos desde a faculdade até a finalização deste trabalho, pela grande amizade, por tudo que fez por mim e também pela disponibilidade para concretização deste trabalho.

A Profa. Dra. Celina Almeida F. Mançanares

pelos momentos de incentivo, pela grande amizade e também pela colaboração neste trabalho.

A Dra. Daniele dos Santos Martins

pela colaboração na realização deste trabalho e pela grande amizade vivida.

A Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

por ceder os animais para a realização deste trabalho.

A **Prof. Dra. Flávia Thomaz Verechia**

pela troca de conhecimento e pela amizade.

As minhas grandes amigas **Caroline, Ana Lídia, Tálita, Michelli, Deborah**

que sempre me apoiaram e participaram da minha vida.

Aos amigos em especial **Adriana Morini e João Carlos Morini Jr.**

pelas ajudas na hora que mais precisei, pela colaboração na realização deste trabalho e pela enorme amizade que cultivei durante todo esse tempo.

Aos amigos **Gerlane de Medeiros Costa, Cristiane Wenceslau, Phelipe Favaron, Marina Brólio, Patrícia Reginato, Rose Eli, Juliana Braz, Tatiana Carlesso, Érika Branco, Walkiria Ferreira, Guilherme Buzon, Rosa Cabral, Simone Machado, Ana Rita, Claudia Kanashiro, Fabiana Matsumoto, Karla Patrícia, Camila Ercoline, Juliana Jarra** e aos **colegas** da Pós-graduação.

Aos professores da FMVZ/USP **José Roberto Kfoury Jr., Paula de Carvalho Papa, Francisco Hernandez Blasques e Pedro Primo Bombonato**

pelos ensinamentos e convivência.

Aos funcionários **Maicon, Jaqueline, Índio, Sandra, Ronaldo** do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP

pela amizade e convivência todo esse tempo, os quais possibilitaram a realização deste projeto.

*... Há quem diga que todas as noites são de sonhos.
Mas há também quem garanta que nem todas, só as
de verão.
Mas no fundo isso não tem muita importância.
O que interessa mesmo não são as noites em si, são
os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre.
Em todos os lugares, em todas as épocas do ano,
dormindo ou acordado...*

William Shakespeare

RESUMO

FRANCIOLLI, A. L. R. **Desenvolvimento embrionário e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens “Germ Cells”**. [Development of embryonic and fetal of pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): establishment of experimental model analogous to murine “Germ cells” lineage detection]. 2007. ---f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O estudo visou elucidar o desenvolvimento embrionário e fetal de pacas (*Agouti paca*) e demarcação dos sítios germinativos nos embriões em diferentes estágios. Foram utilizados sete espécimes de *Agouti paca*, sendo dois embriões e três fetos doados do pacário mantido pela UNESP - Jaboticabal e, dois doados do acervo da FMVZ-USP. Os fetos 1 e 2 apresentaram imaturidade facial acentuada, olhos recobertos por uma lente proeminente e lóbulos das orelhas; os fetos 3 e 4, mostravam-se com orelhas bem desenvolvidas, membros torácicos e pélvicos em grau equalitário de desenvolvimento, como vibrissas ao redor das bordas nasais e olhos também protegidos; no feto 5, haviam pêlos distribuídos por todo o corpo, membros torácicos e pélvicos com garras, vibrissas na face, olhos proeminentes e orelhas bem desenvolvidas. O embrião 1, apresentou a vesícula óptica com pigmentação da retina, o quarto ventrículo encefálico e curvatura cervical acentuada e broto dos membros em desenvolvimento; o embrião 2, possuiu divisão dos arcos branquiais e neuróporo cranial aberto; presença da área cardíaca e fígado; vesícula óptica sem pigmentação da retina, abertura do tubo neural na região do quarto ventrículo encefálico, rombencéfalo e mesencéfalo em desenvolvimento. Na microscopia de luz, visualizamos a medula espinhal, abertura do 4º ventrículo encefálico, presença das vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), coluna vertebral, hipófise, cavidades oral e nasal, olho, átrio e ventrículo cardíacos, pulmão e diafragma, além das cristas metanéfrica e mesonéfrica, fígado, intestino e pedículo umbilical. Nas reações de imunohistoquímicas para OCT-4 não houve marcação expressiva em órgãos tais como pulmão, intestino e somitos, o coração apresentou uma leve positividade à reação, enquanto que nas cristas meso e metanéfrica e fígado obtiveram uma marcação expressiva, sendo mais acentuada no último. Nos testes com vimentina

todos os órgãos mostraram-se imunopositivos em diferentes áreas; e em se tratando da reação a testes com actina apenas a região de somitos não obteve marcação positiva. Concluimos que o período embrionário/fetal da paca não pode ser comparado com o modelo clássico de roedor; sua embriogênese pode ser comparada à de ratos, *Guinea pig*, coelhos e humanos. A imunolocalização positiva de OCT-4 apresenta diferenças de acordo com a idade gestacional, devido às mudanças embriológicas dos tecidos. A imunolocalização positiva de OCT-4 apresenta diferenças de acordo com a idade gestacional, devido às mudanças embriológicas dos tecidos. A vimentina como marcador de mesênquima se expressou positivamente em todos os órgãos do embrião de paca. A actina como imunomarcador de músculo liso foi expressiva nas áreas contendo musculatura.

Palavras-chave: Célula tronco germinativa. Fetos. Imunohistoquímica. Pacas. Placentação.

ABSTRACT

FRANCIOLLI, A. L. R. **Development of embryonic and fetal of pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): establishment of experimental model analogous to murine “Germ cells” lineage detection.** [Desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus 1766): estabelecimento de modelo experimental análogo murino para detecção de linhagens “Germ Cells”]. 2007. ---f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The study aimed elucidates the development of embryonic and fetal of pacas (*Agouti paca*) and demarcation of the germ sites in embryos at different stages. Seven specimens were used; two embryos and three fetuses from UNESP- Jaboticabal and other two fetuses were from FMVZ-USP collection. The fetuses 1 and 2 showed immaturity facial sharp, eyes covered by a lens and prominent lobes of the ears, the fetuses 3 and 4, showed up with well-developed ears, members thoracic and pelvic in equal level of development, vibrisses around the nasal edges and eye also protected;. The fetus 5 had hairs distributed throughout the body, members thoracic and pelvic with claws, vibrisses on the face, prominent eyes and ears well developed. The embryo 1, presented the optic vesicle with pigmentation of the retina, the fourth encephalic ventricle and cervical curvature and button members in development. The embryo 2, had split the branchial arches and open neuropore cranial; heart and liver were identified, optical vesicle without pigmentation of the retina, the neural tube was opening in the region of the fourth encephalic ventricle, rombencephalon and mesencephalon were in development. Light microscopy, shows the spinal cord, 4 th encephalic ventricle, presence of encephalic vesicles (prosencephalon, mesencephalon and rombencephalon), vertebral column, pituitary gland, oral and nasal cavities, eye, atrium and ventricle heart, lung and diaphragm, as well the metanephron and mesonephron, liver, intestine and umbilical pedicle. The immunohistochemical reactions for OCT-4 were non expressive in organs such as lung, intestine and somites; heart presented a discrete positive reaction, while kidneys and liver obtained an expressive expression, more pronounced in the last one. Vimentina's tests showed that all organs stained in different areas, and the reaction whit the actin was negative just in the region of somites. We conclude that the period embryonic/fetal of paca can not be compared with the classical model of rodents; its embryogenesis can be compared with the rats, *Guinea pig*, rabbits and

humans ones. The positive immunolocalization of OCT-4 presents differences according to the gestational age, due to changes embryological tissue. The vimentine as a mesenchyme marker is expressed positively in all organs of the embryo of paca. The actin as immunomarker of smooth muscle was expressive in areas containing muscles.

Key words: Fetus. Germ cells. Immunohistochemical. Pacas. Placentation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Considerações sobre os roedores	14
1.2 Aspectos biológicos da paca (<i>Agouti paca</i>, Linnaeus 1766).....	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Desenvolvimento embrionário: a formação do embrião.....	20
3.2 Anexos embrionários.....	23
3.3 Considerações sobre Placenta	25
3.4 Aspectos sobre Placentação em roedores	28
3.5 Reação de Imunohistoquímica para OCT-4, Vimentina e Actina para músculo liso	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Animais	39
4.2 Colheita do Material.....	39
4.3 Dados Biométricos	41
4.4 Análise Macroscópica	41
4.5 Análise Microscópica	41
4.6 Processamento do material para imunohistoquímica para detecção de Oct-4, vimentina e actina de músculo liso.....	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Análise dos Fetos e Embriões	44
5.1.1 Análise Macroscópica.....	44
5.1.2 Análise Microscópica.....	57
5.2 Imunohistoquímica para detecção de Oct-4, vimentina e actina de músculo liso.....	70
6. DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO A	95
ANEXO B	96

1INTRODUÇÃO

Dentre os mamíferos, a Ordem Rodentia é a mais numerosa, contendo mais de 2000 espécies, o que corresponde à cerca de 40% das espécies da Classe Mammalia.

Os roedores são animais que oferecem uma extraordinária variedade de adaptações ecológicas, suportando os mais diversos tipos de climas e altitudes, podendo com isso apresentar grande diversidade de adaptações fisiológicas. Vislumbram tamanhos e formato de dentição característico, por serem desprovidos de caninos que aliados ao aspecto geral da maioria das formas, os tornam facilmente reconhecíveis. Podem, em função disto, apresentarem-se como arborícolas, rupícolas ou terrícolas, mas com a capacidade de acomodarem-se parcialmente a mais de dois tipos de adaptações biológicas.

1.1 Considerações sobre os roedores

A característica marcante da Ordem Rodentia é à dentição que é altamente especializada para roer e que junto a outras características, possibilitou o enorme sucesso evolutivo desse grupo. Os roedores possuem a arcada dentária superior e inferior composta por um par de dentes incisivos, seguido por um espaço denominado de diastema e por um ou mais molares e pré-molares, onde de acordo com o número de molares, podem ser separados em espécies distintas. Os incisivos dos roedores não possuem raízes e crescem continuamente (dentes hipsodontes). No ato de roer, ocorre o atrito dos dentes incisivos, o que promove o desgaste da dentina, resultando na continua manutenção dos dentes sempre afiados (ORR, 1986).

No Brasil, a fauna de roedores ainda é pouco conhecida, embora se possa afirmar que seja uma das mais diversas do mundo. As informações a respeito dos hábitos e habitats da maioria das espécies são escassas, e até a década de 80,

resultavam de trabalhos voltados somente para a saúde pública (CADEMARTORI et al., 2004).

Os trabalhos desenvolvidos com roedores na grande maioria estão associados ao levantamentos sistemáticos, ocorrência de espécies em uma determinada área e também trabalhos de biologia básica, e estes quando abordam a reprodução, focam-se mais em características como o período reprodutivo, sua duração e comportamento.

Na maioria dos ecossistemas, os roedores são importantes porque se reproduzem rapidamente e em períodos relativamente curtos, servindo de fonte de alimento para predadores. Outra característica marcante é o fato de serem dispersores de sementes e vetores de doenças.

No entendimento dos padrões demográficos, os roedores exibem na maioria das vezes mudanças sazonais, resultando em flutuações na abundância, alterações na taxa de sobrevivência e na estrutura etária. A compreensão desses padrões depende, dentre outros fatores, da identificação das estratégias reprodutivas apresentadas pelas espécies de pequenos mamíferos como resposta aos diferentes desafios impostos pelo ambiente (CADEMARTORI et al., 2005).

1.2 Aspectos biológicos da paca (*Agouti paca*, Linnaeus 1766)

A paca é pertencente à ordem Rodentia, representada no Brasil por três subordens: Sciuomorpha, Myomorpha e Hystricomorfa. É classificada como *Cuniculus paca*, pertencente à subordem Hystricomorfa e à família Cuniculidae (ALHO, 1982). Eisenberg (1989) adotou nova classificação e inseriu a paca na família Agoutidae, gênero Agouti, pertencente à superfamília Caviioidea, que juntamente com as famílias Caviidae, Hydrochoeridae e Dasyproctidae constituem o grupo dos roedores Histricognatas do Novo Mundo. Atualmente, uma nova classificação foi estabelecida por Wilson e Reeder (2005), o qual se pode classificar a paca da seguinte maneira:

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Subordem: Hystricomorpha
- Infraordem: Hystricognathi
- Família: Cuniculidae
- Gênero: Cuniculus
- Espécie: *Cuniculus paca* ou *Agouti paca* (Linnaeus, 1766), conhecida

como paca comum.

Depois da capivara, a paca é o maior roedor da região neotropical (MONDOLFI, 1972; MATAMOROS, 1982; SILVA, 1984); os machos adultos medem de 60 a 80 centímetros, do focinho à ponta da cauda, e as fêmeas, de 55 a 70 centímetros, de acordo com Mondolfi (1972) e Benti (1981). O peso corpóreo varia de 5 a 10 kg, podendo chegar até aos 14 kg, de acordo com Matamoros (1982), mas não ultrapassa 10 kg como relataram Deutsch e Puglia (1988).

A paca é um animal com corpo robusto e vigoroso, especialmente a garupa e os membros pélvicos, notadamente musculosos (VIEIRA, 1953; BENTTI, 1981; COLLET, 1981; SILVA, 1984). A cabeça é triangular e larga, distendida dos lados; os olhos são protuberantes e estão localizados relativamente altos no plano frontal; dos dois lados do focinho há pêlos táteis, largos e sedosos, dirigidos para trás; outro conjunto de pêlos mais curto e delgado insere-se na região temporal, abaixo e a frente dos ouvidos, denominadas vibrissas (MONDOLFI, 1972). Os adultos apresentam dimorfismo sexual (SMYTHE, 1991). Os machos têm a cabeça mais achatada e larga, e as fêmeas mais finas e esguias. Este animal é encontrado desde o sudeste do México até o norte do Paraguai, em altitudes de até 3.000 metros (DEUTSH; PUGLIA, 1988; EMMONS, 1990), adaptando-se bem a ambientes muito variados e preferindo as zonas cobertas com vegetação alta, vizinhas a rios ou riachos (DEUTSH; PUGLIA, 1988).

Collet (1981) relata que as fêmeas de paca podem ter o primeiro cio com aproximadamente um ano de idade, assim como com essa idade os machos têm início em sua atividade sexual.

Quanto ao período de prenhez desses animais, há diferentes citações na literatura. Este período não ultrapassaria 115 dias de acordo com Pérez e Hernandez (1979); Kleiman et al. (1979) e Clark e Olfert (1986). Já mediante as citações de Collet (1981), não excederia 116 dias. Para Matamoros e Pashov (1984) o período abrange 114,28 dias, em média, com variação de 85 a 156 dias, e para Smythe (1991), é em torno de 155 dias, variando de 138 a 173 dias. Nogueira (1997) citou um período de prenhez de aproximadamente 150 dias, enquanto Oliveira (2002), em pesquisa utilizando a ultra-sonografia para determinação do período de prenhez, concluiu que o mesmo abrange 135 a 139 dias nessa espécie.

Mondolfi (1972); Pérez e Hernandez (1979); Benti (1981) e Matamoros (1982) citaram que, geralmente, nasce um filhote por parto e, dificilmente, dois ou três. O ciclo reprodutivo da fêmea é de 28 a 31 dias e o ciclo estral pode ocorrer logo após o nascimento e, novamente, após o desmame. Após 28 dias do nascimento, ocorre um novo ciclo estral pós-parto (HOSKEN, 1999).

A paca é um animal de útero bicórneo e cada corno mede, aproximadamente, 12 cm de comprimento, sendo unidos externamente por meio de uma fina membrana, que forma um falso corpo. Os ovários estão localizados caudalmente aos rins e são amarelados, ovalados e lisos, com cerca de 0,8 cm de comprimento e 0,5 cm de largura. As tubas uterinas são finas, contorcidas, medem, aproximadamente, 5 cm de comprimento e estão em contato com a superfície medial dos ovários (MATAMOROS, 1981).

Nogueira (1997), trabalhando com pacas em cativeiro, descreve que a espécie, exibe uma reprodução do tipo poliestral, com estimativa de produção de duas parições anuais por fêmea e apenas um filhote por cria, observações estas, semelhantes aos relatos para a espécie na natureza, fato que, segundo o autor, sugere aptidão à domesticação e adaptação da espécie ao cativeiro.

O autor também chama atenção ao fato de que os filhotes nascidos em cativeiro tornam-se mais dóceis e manejáveis, facilitando a formação de novos grupos de animais menos suscetíveis a agressões interespecíficas.

Björkman et al. (1989) relataram que os roedores, por apresentarem aspectos característicos, tais como, tamanho adequado, baixo custo de manutenção e curto período de prenhez, são considerados animais experimentais "*ad hoc*" embora ainda falem informações precisas sobre aspectos reprodutivos de algumas espécies, o que gera, muitas vezes, interpretações errôneas de experimentos. Neste contexto, a

importância da busca de novas espécies animais com potencial para serem utilizados como modelos experimentais, colaborando com o desenvolvimento de pesquisas vitais ao homem e aos próprios animais (HAMELETT; RASWEILER IV, 1993).

Embora existam dados que contribuam com diversas informações técnicas sobre a biologia e manejo deste animal, vários aspectos da morfofisiologia do seu sistema urogenital, da placenta, e particularmente sobre seu desenvolvimento embrionário/fetal carecem de estudos mais detalhados, em face, de grande importância que apresentam, especialmente quando se busca o melhor conhecimento destes mamíferos, visando otimizar a sua reprodução. Juntamente a isto, a obtenção de informações sobre os aspectos reprodutivos deste animal vem a oferecer subsídios para uma produção racional e, conseqüente preservação desta espécie na natureza, pois a mesma representa uma importante fonte de proteína de origem animal para algumas populações rurais, e assim é explorada indiscriminadamente, fato este crucial na significativa redução na densidade populacional destas espécies em algumas regiões.

2 OBJETIVOS

Para melhor compreensão da objetividade deste estudo, dividimos o foco de nossa pesquisa em subitens descritos abaixo:

2.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa tem como objetivo, a análise do desenvolvimento embriológico e fetal em paca (*Agouti paca*) e demarcação dos sítios germinativos nos embriões em diferentes estágios, com vistas ao estabelecimento de um modelo Histricomorfo Sul-Americano, comparativamente aos achados nos modelos murinos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 – Acompanhar o crescimento e a formação das estruturas embrionárias;
- 2 – Analisar morfométricamente o embrião;
- 3 – Marcar com OCT-4 os sítios germinativos em diferentes faixas etárias dos embriões.
- 4 – Utilizar marcação com imunohistoquímica para mesênquima e para músculo liso, com vista a elucidar o desenvolvimento no embrião.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A subordem Hystricomorpha possui várias características em comum sob termos placentários e de desenvolvimento dentro de suas espécies correlatas, e da mesma forma com outros grupos de roedores. Dentre tais características compartilhadas pela subordem Hystricomorpha, podemos destacar a fixação da placenta na parede mesometrial do útero, além de uma relevância das membranas fetais e placenta, que se modificam junto ao avanço da gestação e, que se acredita fazer parte do processo do desenvolvimento fetal (RODRIGUES, 2002).

Ainda dentro de características placentárias, estudos têm mostrado inúmeras outras semelhanças macro e microscópicas entre espécies correlatas desta subordem, assim como em outros grupos de mamíferos (FERRAZ, 2001).

Em vista disso, todo o texto que se segue busca principalmente comparações entre diferentes espécies de roedores dentro da subordem Hystricomorpha, tais como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), paca (*Agouti paca*), cutia (*Dasyprocta aguti*), cobaia (*Cavia* spp.), mocó (*Kerodon rupestris*), ratão do banhado ou nutria (*Myocastor coypus*) e a chinchila (*Chinchilla* spp.), assim como em outros grupos de mamíferos roedores, tais como o Castor americano (*Castor canadensis*, subordem Sciurognathi).

3.1 Desenvolvimento embrionário: a formação do embrião

O momento da fertilização consiste na fusão dos gametas masculinos e femininos para formar uma única célula, sendo este um processo duplo; em seu aspecto embriológico envolvendo a ativação do ovócito pelo espermatozóide, sem o estímulo da fertilização, o ovócito não completa a sua mitose e nem ocorre à formação do zigoto, e conseqüentemente não ocorre o desenvolvimento embrionário, já em seu aspecto genético, fertilização envolvendo a introdução do

material hereditário do macho dentro do ovócito para posterior fusão dos pró-núcleos (HAFEZ, 1982; PERIS et al., 1998; MOORE; PERSAUD, 2004).

Hafez (1982) propõe que as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, anteriores a ativação gênica do embrião são provavelmente prescritos pelos produtos maternos estocados. O melhor indicador de maturação de ovócito é o desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto.

Arthur (1979) em mamíferos domésticos e Moore e Persaud (2004) para humanos descrevem a formação do embrião e seus anexos a partir do ovócito sendo fertilizado na ampola da tuba uterina, onde o zigoto sofre segmentação à medida que ele se desloca passivamente na direção do útero. Estes autores ainda complementam que a tuba uterina é um dos locais mais importantes nos processos reprodutivos, visto que na tuba ocorrem os eventos da capacitação e transporte do espermatozóide, o transporte do ovócito, a fecundação e desenvolvimento dos primeiros estágios embrionários que antecedem a implantação. Seu fluído é proveniente da secreção das células mucosas do epitélio e do transudato seletivo sangüíneo. Formando o epitélio da tuba uterina bovina aparecem dois tipos celulares: as células ciliadas e as secretoras não ciliadas, ambas influenciadas por hormônios ovarianos, a progesterona e o estrogênio. Estas células ciliadas estão envolvidas no transporte do ovócito e possivelmente, na regulação da progressão espermática.

Moore e Persaud (2004) relatam que essas mesmas células participam da reação de capacitação dos espermatozóides, enquanto que, as células não ciliadas secretam fatores ligados à nutrição dos espermatozóides e das células nos primeiros estágios embrionários.

Seguindo a fertilização, inicia-se a clivagem do zigoto com a formação dos blastômeros através de uma série de divisões mitóticas (FLETCHER; WEBER, 2004), e como resultado das contrações peristálticas e ciliares normais da tuba uterina, as células embrionárias são impulsionadas em direção ao útero. Quando os blastômeros alcançam o útero, a figura embrionária apresenta-se formada por dezesseis a trinta e duas células originadas por mitoses sucessivas, originando assim a mórula. Trata-se de um aglomerado celular compacto e envolvido pela membrana de fertilização (HAFEZ, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004).

Moore e Persaud (2004) dizem ainda que, o acúmulo gradual de líquido aparece na parte central da cavidade da mórula. Os blastômeros afastados pelo

líquido passam a constituir uma camada periférica, o trofoblasto; espessada num ponto onde permanece um aglomerado celular, o embrioblasto ou massa celular interna, que faz saliência para dentro da cavidade, constituindo o blastocisto.

Hafez e Hafez (2004) relatam que em alguns animais, as células do trofoblasto durante e após a nidação no endométrio, secretam o hormônio gonadotrofina coriônica que prolonga o período de vida útil do corpo lúteo além do ciclo estral; este período é denominado de reconhecimento materno de prenhez. Estes autores ressaltam que o peso do corpo lúteo está diretamente relacionado com sua capacidade de produzir progesterona, e esta é adequada ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio corpo lúteo durante o período crítico da vida embrionária (da ovulação à implantação), quando ocorre o reconhecimento materno-fetal na gestação.

Após a implantação do embrião, o endométrio modifica-se e passa a ser chamado de decídua, distinguindo-se em decídua basal localizada entre o embrião e o miométrio, decídua capsular entre o embrião e a luz do útero e decídua parietal, que é o restante da decídua. Neste estágio de desenvolvimento já existe um mesênquima extra-embrionário, derivado do hipoblasto que aparece no blastocisto contribuindo para formação dos anexos embrionários (MOORE; PERSAUD 2004).

Células do embrioblasto por diferenciação formam o epiblasto, que junto com o hipoblasto passam a formar o embrião bidérmico ou disco embrionário bilaminar. No interior do epiblasto surge uma cavidade que é o primórdio da cavidade amniótica e células derivadas do epiblasto localizadas lateralmente e dorsalmente, passando a constituir os amnioblastos, passando a formar o âmnio que reveste a cavidade amniótica e o futuro saco amniótico na região dorsal do disco embrionário. O hipoblasto prolifera ventralmente ao epiblasto e passa a revestir internamente a cavidade blastocística e constitui o saco vitelino primitivo. Células se despendem do hipoblasto e passam a se posicionar entre o hipoblasto e o citotrofoblasto, formando o mesoderma extra-embrionário (MOORE; PERSAUD 2004).

Do epiblasto surge o ectoderma que forma o âmnio, que futuramente forma o embrião, e as células da linha primitiva formam parte do mesoderma extra-embrionário, o mesoderma do embrião, processo notocordal e endoderma do embrião. O hipoblasto é responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e de parte do mesoderma extra-embrionário. O aparecimento da linha primitiva, o desenvolvimento da notocorda e a diferenciação dos três

folhetos germinativos são eventos que ocorrem a partir do disco embrionário bilaminar e caracteriza-se por um rápido crescimento do embrião (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

Com o surgimento dos três folhetos embrionários, os mesmos durante a morfogênese são responsáveis pela formação dos órgãos e sistemas. No embrião, passam a ocorrer movimentos de dobramentos laterais e antero-posteriores que resultam na inflexão do embrião e o mesmo passa a adquirir um aspecto tubular em forma de letra C (MOORE; PERSAUD, 2004).

Os esboços dos membros aparecem no primeiro mês, sob a forma de pequenos cotos, que mais tarde se digitaram e se dividiram distalmente em artículos (MOORE; PERSAUD, 2004).

Os somitos ou segmentos corpóreos desenvolvem-se do extrato externo do mesoderma. Eles representam a base da qual a maior parte do esqueleto axial e a musculatura se desenvolvem. Os somitos se diferenciam em três regiões. A primeira região desenvolve-se em vértebras que encaixam a tuba neural. A segunda região, a parte superior próxima ao tubo neural, forma os músculos esqueléticos. A terceira região, que é a porção mais inferior dos somitos, forma os tecidos conjuntivos da pele (HAFEZ, 1982; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Durante o segundo mês, o embrião está menos encurvado, o fígado aumentou relativamente de dimensões e faz agora maior proeminência do que o coração. Os esboços dos membros já estão digitados e divididos em segmentos, o orifício bucal já está separado das fossas nasais e os olhos são bem visíveis, pois ainda não há pálpebras. A partir do terceiro mês o embrião começará a receber a designação de feto, pois sua forma geral já está definida e os esboços todos marcados (MOORE; PERSAUD, 2004).

3.2 Anexos embrionários

Além do estudo das modificações estruturais do embrião para a formação do corpo, é também de grande relevância uma análise das modificações que geram as estruturas extra-embrionárias. Existem quatro diferentes estruturas membranosas

que estão envolvidas no desenvolvimento da placenta: cório, âmnio, alantóide e saco vitelino (GARCIA; JECKEL NETO; FERNANDEZ, 1991).

O cório é uma camada epitelial derivada da parede externa do blastocisto, o trofoblasto. Durante o curso de implantação ele é completado pela camada interna do mesênquima derivado do embrião. O mesmo está envolvido no intercâmbio gasoso respiratório. Em mamíferos, ele é parte da placenta, e também está envolvido com a nutrição e eliminação de resíduos. É uma película delgada que envolve os outros anexos embrionários e suas vilosidades coriônicas, que darão origem à mucosa uterina, participando junto com o alantóide para a formação da placenta (WOLPERT et al., 2000).

O âmnio é uma camada derivada da divisão (roedores e primatas) ou dobramento (mamíferos) do ectoderma embrionário. O mesmo é uma fina membrana que delimita uma bolsa repleta de líquido - o líquido amniótico que tem função de proteger o embrião contra choques mecânicos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide é um conjunto de membranas extra-embrionárias que se desenvolve em alguns embriões de vertebrados. O alantóide surge de uma evaginação da parte posterior do intestino do embrião. Em embriões de aves e répteis ele atua como uma superfície respiratória, enquanto, em mamíferos, os seus vasos sanguíneos transportam sangue entre o embrião e placenta. O alantóide pode também absorver os minerais presentes nas cascas dos ovos, promovendo a partir daí a formação do esqueleto. Nos mamíferos associa-se ao cório para formar a placenta e o cordão umbilical (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário, formando-se a partir de uma camada de epitélio endodérmico seguido de um mesênquima fetal vascularizado (LEISER; KAUFMANN, 1994). Corresponde a uma estrutura em forma de saco ligada a região ventral do embrião. Sua principal função é armazenar reservas nutritivas. Nos mamíferos placentários é reduzido, visto que a nutrição ocorre via placentária (SANTOS; AZOUBEL, 1996).

A placenta é uma estrutura de origem mista, exclusiva dos mamíferos. Permite a troca de substâncias entre o organismo materno e o fetal. Nos primeiros meses de gestação, a placenta trabalha produzindo hormônios, além de substâncias de defesa, nutrição, respiração e excreção. O tamanho e função da placenta se alteram continuamente durante o curso da gestação (HAFEZ, 1982).

O cordão umbilical é o anexo que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos alantoideanos (umbilicais). Apresenta duas artérias e uma única veia, estruturas que garantem a nutrição e respiração do embrião (SANTOS; AZOUBEL, 1996).

3.3 Considerações sobre Placenta

A placenta é o órgão que se forma em função do sucesso da implantação do blastocisto no útero, representando o órgão funcional da unidade biológica materno-fetal e é, tanto do ponto de vista morfológico como funcional, um órgão muito complexo, que no curso de seu desenvolvimento apresenta não somente modificações quantitativas e qualitativas de sua estrutura macroscópica geral, mas também diversas modificações microscópicas (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Junqueira e Carneiro (2004) a placenta é tida como um órgão transitório, encontrado apenas em mamíferos e é o intermédio das trocas fisiológicas entre a mãe e o feto. É constituída por uma parte fetal denominada de córion que consta de uma placa corial de onde partem vilos coriônicos, esses vilos constituem-se de uma parte central conjuntiva, derivada do mesênquima extra-embriônico, e pelas camadas de citotrofoblasto e de sinciotrofoblasto; e uma parte materna denominada de decídua basal, que fornece sangue arterial para as lacunas situadas entre os vilos secundários e recebe de volta o sangue tornando-o venoso nessas lacunas, sendo possível afirmar ainda que a placenta seja o único órgão formado por células de dois indivíduos diferentes. A placenta é constituída por células genética e imunologicamente diferentes (da mãe e do feto).

Dyce et al. (1997) mencionam que a placenta é um órgão que pode ser definido como a aposição ou fusão de tecido fetal e materno para objetivos de modificação fisiológica e produção hormonal. Segundo os autores, apesar de uma placenta provisória poder ser estabelecida pelo saco vitelínico e fornecer um órgão útil de modificação no início da gestação, a estrutura definitiva nos mamíferos eutérios é a placenta. Sendo ainda que para os marsupiais e roedores o saco vitelínico consiste na principal contribuição do feto para a placenta (HILDEBRAND, 1995).

A placenta definitiva nos mamíferos eutérios envolve o cório e o alantóide e é vascularizada pelos vasos sanguíneos umbilicais. Esta é a placenta corioalantóidea. No início do desenvolvimento, muitos mamíferos apresentam uma placenta coriovitelínica formada pelo cório e pelo saco vitelínico. Um certo número de mamíferos, incluindo os roedores, retém o saco vitelínico até o final, porém apresentam parcial ou completa inversão das camadas germinativas. O trofoblasto às vezes, invade a parede do útero deslocando e ou substituindo uma ou mais camadas de tecido. As placentas são classificadas como epiteliocorial, endoteliocorial, ou hemocorial de acordo com a forma de sobreposição e relacionamento do trofoblasto no epitélio uterino, no endotélio dos vasos maternos, ou diretamente com o sangue materno (CARTER et al., 2004). As placentas de roedores são classificadas como o tipo hemocorial, pois nestes animais a interação materno-fetal resulta da invasão do leito vascular uterino pelo trofoblasto, que passa a ser banhado pelo sangue materno extravasado (OLIVEIRA, 2004).

Nakage et al. (2005) destacaram que o cordão umbilical é o anexo fetal que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos umbilicais, que são responsáveis pelas trocas sanguíneas entre os organismos fetais e maternos. O cordão umbilical é um cabo vascularizado que conecta o embrião ou feto à placenta. É curto, formado pelo ducto alantóide e por vasos sanguíneos (duas artérias e duas veias umbilicais) rodeados pelo âmnio (LATSHAW, 1987). Origina-se dos envoltórios amnióticos ao redor do saco vitelínico e envolve os vasos alantóides (JAINUDEEN; HAFEZ, 1995).

As trocas de substâncias entre o sangue fetal e o materno, ocorrem na superfície dos vilos coriais, esses vilos são banhados pelo sangue das lacunas da decídua basal que na verdade são os espaços intervilosos da placenta.

A placenta pode ser atravessada por diversas substâncias, e normalmente ela transfere do sangue materno para o fetal: oxigênio, água, eletrólitos, glicídios, lipídeos, proteínas, vitaminas, hormônios, anticorpos e alguns medicamentos. E do sangue fetal para o materno passam: gás carbônico, água, hormônios e produtos residuais do metabolismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A placenta é um órgão com uma vascularização muito ativa. Admite-se que cerca de 20.000 litros de sangue atravessem este órgão num período de 24 horas. Seus vasos tendem a evoluir à medida que ela se desenvolve, no entanto, o sangue materno e o fetal não se misturam (ALMEIDA et al., 2000). Porém, algumas vezes

em proporções muito pequenas no final da gestação pode haver mistura de sangue materno com o fetal quando o citotrofoblasto não é mais contínuo e os capilares dos vilos estão muito próximos da superfície.

Jainudeen e Hafez (1995) relataram que as artérias umbilicais levam sangue do feto para a placenta, e que as veias fazem o percurso inverso. O fluxo umbilical aumenta com o avanço da gestação, satisfazendo as demandas do feto em crescimento. Vários modelos teóricos têm sido propostos para explicar a direção do fluxo sangüíneo materno fetal na placenta. O fluxo sangüíneo nos canais vasculares maternos e fetais adjacentes pode ser contracorrente, corrente, entre corrente (multivilosidades), ou acumulado. No fluxo acumulado, o sangue materno entra em um grande espaço no qual ele é exposto aos capilares fetais.

O crescimento placentário não acompanha o mesmo ritmo do crescimento fetal. O crescimento da placenta nos estágios finais da gestação equivale à quantidade de nutrientes que está à disposição do feto, sugerindo então que a placenta cresce além de suas necessidades no início da gestação, preparando-se para a grande demanda metabólica do crescimento fetal no final da gestação. O fluxo sangüíneo adequado para a placenta parece ser crítico para um crescimento fetal normal (SCHNEIDER, 1996; ALMEIDA et al., 2000).

Jainudeen e Hafez (1995) relatam que a placenta desempenha muitas funções, substituindo o trato gastrointestinal, os pulmões, os rins, o fígado e as glândulas endócrinas do feto, na vida pós-natal essas funções são assumidas por diferentes órgãos (SCHNEIDER, 1996). O sangue fetal e materno nunca entra em contato direto, embora as duas circulações sejam suficientemente íntimas na junção do cório e do endométrio para a passagem de oxigênio e nutrientes em direção materno-fetal e de produtos de excreção na direção oposta. Além disso, a placenta é um órgão endócrino, elaborando gonadotrofina coriônica, estrógeno, progesterona, hormônio adrenocorticotrófico coriônico e hormônio tireotrófico coriônico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A placenta é um órgão que apresenta uma morfologia bastante diversificada, apresentando uma grande diversidade de tamanho, arquitetura e componentes da barreira materno-fetal, sujeito a um padrão de variabilidade nos diferentes mecanismos, que são ativados no seu desenvolvimento, garantindo a formação de um órgão altamente eficiente para a troca respiratória, troca de nutrientes e também de metabólicos. Para esta finalidade, desenvolveram-se nos mamíferos ao longo do

processo evolutivo de cada espécie, uma grande variabilidade morfológica no que diz respeito à placenta.

Variabilidade esta que se refere ao tipo e número de membranas envolvidas ao formato externo do órgão, ao modelo geométrico da interdigitação das superfícies maternas e fetais, que acaba por constituir a barreira placentária (separação anatômica entre a circulação materna e fetal, sendo de origem completamente fetal) (FITZGERALD; FITZGERALD, 1997), e ao modelo geométrico dos vasos sanguíneos maternos e fetais (OLIVEIRA, 2004). No curso da organogênese, o modo como surgem estas modificações na placenta no decorrer da gestação, correspondendo ao aumento da atividade placentária para alguns e diminuição para outros, tem intrigado pesquisadores o que vem permitindo a estes desenvolverem uma série de pesquisas acerca deste órgão tão peculiar que é a placenta.

3.4 Aspectos sobre Placentação em roedores

Trabalhos abordando caracteres morfológicos e a morfogênese da placenta de roedores, no Brasil, ainda são muito escassos, especialmente, quando se trata de espécies silvestres..

Normalmente as espécies da classe Rodentia possuem uma placenta discoidal, labiríntica e hemocorial, sendo encontrado na massa mesenquimal uma série de estruturas como a subplacenta, a placenta vitelínica, membrana de Reichert's e também células gigantes.

A interação entre os tecidos maternos e a membrana coriônica gera a porção materna da placenta, enquanto a formação da placenta fetal inicia-se ao fim da primeira metade da gestação, quando o mesoderma alantoideano alcança a região basal do cone ectoplacentário. O mesênquima fetal invade o interior do cone ectoplacentário, sendo margeado por células trofoblásticas, e constitui a principal região de trocas da placenta que corresponde ao labirinto (OLIVEIRA, 2004).

A placenta vitelínica é tida como uma placenta funcional em roedores, antes da formação da placenta corioalantóidea, é de grande importância, pois é a única estrutura presente no feto com a responsabilidade nos processos de trocas entre mãe e feto (OLIVEIRA, 2004).

A placentação em roedores é caracterizada pela formação de duas membranas placentárias diferentes. Além da placenta corioalantóidea que promove uma relação hemocorial entre o sangue materno e o fetal, existe uma placenta vitelínica visceral.

O modo de evitar um contato prolongado do trofoblasto com o tecido conjuntivo materno é a migração rápida do trofoblasto no endométrio e invasão de vasos maternos para que se estabeleça uma condição hemocorial. Em ratos é observada a formação de uma placenta hemotricorial labiríntica (ENDERS; WELSH, 1993).

Segundo Davies, Dempsey e Amoroso (1961) ao estudarem o desenvolvimento, a histologia e a histoquímica da subplacenta do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), os autores descrevem que no meio da gestação, a placenta corioalantóidea é composta por um sincício grosso contendo apenas seios de sangue materno e um sincício fino contendo seios maternos e vasos fetais. Baseando-se em dados obtidos ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão, os autores definem a subplacenta como uma região especializada do cório resultante da proliferação e pregueamento do ectoderma fetal na base da escavação central ou mesodermal no centro de uma placenta corioalantóidea.

Fischer (1971) descreveu a implantação no castor americano (*Castor canadensis*) relatando que a implantação nestes animais ocorria de forma superficial e antimesometrial. O autor caracterizou a placenta dessa espécie como “reniforme”, desenvolvida ao redor da papila endometrial, com interdigitação do tipo labiríntica e arquitetura lobada. A barreira placentária na espécie foi identificada como hemodicorial com a camada trofoblástica interna de natureza sincial e a externa do tipo celular.

Tam e Burgess (1977) estudaram a placenta do porquinho-da-índia, os autores mencionam que nos primeiros dias da gestação, as placentas dessa espécie são constituídas por células trofoblásticas representadas por citotrofoblastos de núcleos relativamente pequenos, associado a um citoplasma escasso e mesmo basófilo. Essas células são encontradas na região esponjosa, na região de interlóbulo e também na região mesometrial. É dito ainda pelos autores que inicialmente o desenvolvimento do sincício da zona labiríntica ocorre de maneira desorganizada somente aos quarenta dias e o sinciotrofoblasto encontra-se na sua típica fora de zona labiríntica, organizado de forma radiada, bem vascularizado e com anastomoses.

As células da placenta vitelínica em fases iniciais de gestação são pequenas, ovóides e dispostas tangencialmente ao disco da placenta. Quando se tornam maduras, essas células constituem um epitélio colunar com citoplasma celular volumoso, formando a porção parietal da placenta vitelínica, enquanto que as células endodérmicas formam a placenta vitelínica visceral (TAM; BURGESS, 1977).

Dantzer, Leiser e Kaufmann (1988) classificaram a placenta da chinchila e do porquinho-da-índia como discoidais, labirínticas e hemomonocorial, sendo compostas por lóbulos supridos por capilares fetais e lacunas maternas. No estágio inicial do desenvolvimento placentário desta espécie ocorre a formação do labirinto que corresponde aos lóbulos placentários.

Carvalho et al. (1996), estudando as membranas fetais da cutia dourada (*Dasyprocta aguti*) analisaram a constituição anatômica das membranas fetais e classificaram o útero como bicornuado, ricamente vascularizado, em face da gestação, e com paredes intensamente delgadas permitindo a visualização das membranas fetais e seus líquidos. Os cornos uterinos apresentaram um rápido afilamento na região de transição com a tuba uterina. Os vasos arteriais mostravam trajeto tortuoso e eram bem mais numerosos quando comparados aos vasos venosos.

Bonatelli (2001) analisou morfologicamente placentas em estágios intermediários e finais de gestação, em nove pacas (*Agouti paca*), com auxílio de microscópio de luz e microscópio eletrônico de transmissão, e afirma que a paca é um roedor dotado de uma placenta do tipo vitelínica e outra do tipo corioalantóidea. A placenta vitelínica possui uma área visceral, composta por dobras e vilos com numerosas projeções digitiformes, e uma área vitelínica parietal revestida por células endodérmicas e por células trofoblásticas diferenciadas, denominadas espongiotrofoblastos, encontrada apenas em placentas em estágio intermediário de gestação. A placenta corioalantóidea é labiríntica e composta de lóbulos com três regiões distintas; o centro do lóbulo, contendo artérias e veias circundadas por células trofoblásticas; o labirinto, caracterizado como a região de maior local de trocas materno-fetais; e o interlóbulo, como região comum a vários lóbulos placentários compostos por cordões trofoblásticos de natureza sincicial. O fluxo sanguíneo com base no comportamento dos vasos placentários foi classificado como do tipo contracorrente e a barreira placentária como hemomonocorial.

O comportamento das membranas fetais da paca (*Agouti paca*) foi descrito em um único exemplar por Machado et al. (1996), os quais utilizaram látex Neoprene colorido injetado no sistema arterial. Externamente no corno uterino gestante identificaram uma disposição radiada das ramificações arteriais uterinas e útero-ovariano e várias anastomoses. Um único feto, localizado no corno uterino esquerdo foi visto envolvido pelas membranas fetais. A membrana corioalantóidea apresentava em sua extensão duas veias bem evidentes funcionando como tirantes de sustentação. Observaram ainda pequena quantidade de líquido amniótico e alantóideo e uma placenta do formato discoidal.

Miglino et al. (1996) estudaram as membranas fetais e o útero gravídico de seis exemplares de capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*). O útero do roedor foi classificado como bicornuado, e podia apresentar ambos os cornos gestantes com formato fusiforme no local onde se situavam os fetos. Na área de implantação podiam ser vistos inúmeros vasos dilatados e tortuosos, diferentemente dos que se dirigiam para as áreas circunvizinhas, que eram retos e finos.

Em estudo de placentas de termo de degu (*Octodon degus*) foi observado por Bosco, Diaz e Borox (1997) que em placentas de sessenta dias de prenhez, a subplacenta apresentou-se ao microscópio de luz volumosa e imbricada entre a placenta e a decídua basal sendo constituída por capilares e mesênquima fetal, porém, nas placentas com noventa dias de gestação não foi observada a subplacenta.

A placenta de degu (*Octodon degus*) foi estudada por Kerstschnska, Schöder e Kaufmann (1997), onde os autores classificaram a mesma, como sendo corioalantóidea, labiríntica e hemomonocorial.

Neves (2000), em trabalho de tese de doutorado com biologia da reprodução de cutias, estudou o útero gestante e a morfologia da placenta e do cordão umbilical de nove cutias criadas em cativeiro. Neste estudo ele descreve os vasos que suprem o útero gravídico, os aspectos macroscópicos da placenta e os vasos e ductos que compunham o cordão umbilical. A placenta da cutia, segundo suas observações, apresentava lóbulos placentários reunidos por um espesso tecido colágeno, cada um apresentando um “centro lobular”. O cordão umbilical apresentou-se constituído por três artérias, uma veia e um ducto alantóide com lúmen irregular e com parede fina quando comparado às paredes dos vasos do funículo umbilical.

Ferraz (2001), em estudo macro e microscópico de onze placentas de termo de capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*), utilizando técnicas para uso de microscópio de luz e de microscopia eletrônica de transmissão, identificou uma placenta vitelínica e uma placenta corioalantóidea constituída por lobos e lóbulos placentários, irregulares, coexistindo juntas até o final da gestação, exibindo uma forma discóide irregular e fixada à região mesometrial do útero pelo pedúnculo placentário. Um sistema vascular materno-fetal realizava trocas através de um sistema de contracorrente e a barreira placentária era do tipo hemomonocorial, constituída de sinciotrofoblasto como o principal componente celular.

Ferreira et al. (2001) desenvolveram pesquisa onde descrevem macroscopicamente a placenta e as membranas fetais do rato do banhado (*Myocastor coypus*), considerando o fato de que esta espécie encontra-se em processo de extinção, bem como visando criar perspectivas de melhorias na reprodução destes animais. No animal estudado os autores identificaram, com as membranas fetais ainda intactas, a presença de um resquício do pedículo vitelínico, causando uma pequena retração do alantocório ao lado direito com relação ao feto. O alantocório apresentou-se com intensa vascularização e a bolsa amniótica aparentemente avascular era bem translúcida. O cordão umbilical apresentou-se com formato de “Y”, com um ramo vascular ligando o feto à placenta e outro ligando o feto à membrana alantoídea, apresentando no seu trajeto uma estrutura discoidal de onde se originam os demais vasos do alantocório. Já a placenta foi classificada como discoidal e lobada.

Pesquisando a morfologia da placenta e anexos fetais da paca (*Agouti paca*), Silva (2001) descreveu macro e microscopicamente o cordão umbilical e observou, com base em medidas obtidas do comprimento dos cordões umbilicais e do comprimento fetal, que o comprimento do cordão equivale à metade do comprimento fetal. Também verificou, com base na técnica de dissecação empregada, que o cordão umbilical apresenta duas artérias e uma veia umbilicais, o ducto alantóide e vasos onfalomesentéricos envoltos pelo mesênquima fetal (geléia de Wharton). Microscopicamente, descreveu ainda as camadas que compõem as artérias e veias, o lúmen dos vasos e o epitélio que constituía a parede do ducto alantóide como sendo do tipo bi-estratificado cúbico.

Rodrigues (2002) estudou a morfologia e a microvascularização de placentas de cutias (*Dasyprocta aguti*) em diferentes fases de gestação. Macroscopicamente,

ela descreveu a placenta como esférica e estruturalmente lobulada, conectada ao útero através de uma mesoplacenta e, microscopicamente, como sendo constituída por interlóbulos delimitando lóbulos placentários. Com base em resultados encontrados na microscopia de varredura, a autora sugeriu um modelo de fluxo sangüíneo do tipo contracorrente, onde o sangue fetal flui centriptamente do interlóbulo para o centro do lóbulo, enquanto o sangue materno desloca-se centrifugamente.

Considerando a natureza hemocorial, labiríntica, o fluxo sangüíneo placentário e a proporção entre o peso da placenta e o peso do feto, a mesma, afirma ter a placenta alto grau de eficiência.

No trabalho de Pijnenborg e Vercruysse (2006) os autores relatam que Mathias Duval (1844 -1907) foi um dos pioneiros na elucidação da intrigante histologia placentária de diferentes mamíferos, dando ênfase à placenta dos roedores. Ele descreveu em detalhes o desenvolvimento da placenta, e para confirmar os dados, o pesquisador incluiu observações de coleções de dados de outras espécies de ratos. Não somente ele foi capaz de identificar corretamente as diferentes camadas de células extra-embrionárias, mas ele foi também o primeiro a reconhecer a invasão do trofoblasto em roedores. Mathias Duval subdividiu o desenvolvimento da placenta dentro de três períodos: (1) o período de formação da “ectoplacenta” pela fusão da parede celular da cavidade ectoplacentária com o cone ectoplacentário (dias 8-10), (2) o período de desenvolvimento da placenta, que começa pela fusão do mesênquima do alantóide da ectoplacenta (dias 11-17), e (3) o período final de maturação da placenta (dias 18-21).

3.5 Reação de Imunohistoquímica para OCT-4, Vimentina e Actina para músculo liso

Vejsted, Offenbergl e Maddox-Hyttel (2006), em pesquisas envolvendo células tronco, demonstraram que a proteína OCT-4 é a mais utilizada como marcador de pluripotencialidade da célula. Um gene extensamente caracterizado e associado a pluripotencialidade é o gene codificado OCT-4 (MITALIPOV et al., 2003), sendo primeiro descrito em células tronco embrionárias de camundongos (OKAMOTO et

al., 1990). Ainda em estudo, constataram que em camundongos e suínos esse marcador se restringe à linhagem germinativa de células primordiais.

O programa de desenvolvimento das linhagens celulares germinativas envolve diferenciação de dois tipos de células especializadas, espermatozóides e oócitos, cuja fusão é a subsequente regeneração das células germinativas (YEOM et al., 1996). As células progenitoras germinativas (PGCs) são precursoras, facilmente reorganizadas nos gametas de camundongos; durante a gastrulação as células mesmas agrupam-se em 100 células, dentro da linha média do mesoderma extra-embrionário (GINSBURG; SNOW; McLAREN, 1990).

O OCT-4 de camundongos é a 352^a proteína aminoácida pertencente à classe V das proteínas POU (Pict-Oct-Unc), que expressam a totipotencialidade das células embrionárias (PESCE; SCHÖLER, 2001). Inicialmente expressas em blastômeros e no desenvolvimento de embriões, o gene de expressão OCT-4 provém da massa celular interna (MCI), o qual é regulado no trofoectoderma e no endoderma primitivo. Após o desenvolvimento, a expressão do OCT-4 é mantida no ectoderma embrionário até o estágio cilíndrico do embrião e somente algumas células mantêm a expressão do OCT-4, até a inativação do gameta na diferenciação sexual (PESCE; SCHÖLER, 2000).

Camundongos OCT-4 positivos, codificados pelo gene *Pou5fl*, desenvolvem papel importante no estabelecimento e manutenção de uma população de células pluripotentes no desenvolvimento de embriões de camundongo. O marcador OCT-4 é expresso em células pluripotentes como nos blastômeros em estágio de clivagem, na massa celular interna do blastocisto, no epiblasto do embrião jovem pós-implantação, e nas células tronco embrionárias (KUROSAKA; ECKARDT; MCLAUGHLIN, 2004).

As células germinativas fetais humanas foram classificadas em diferentes subpopulações: os gonócitos e prospermatogônias (WATENBERG, 1981), os quais foram identificados entre 8 a 10 tipos e células germinativas em embriões humanos de 13 semanas, que apresentaram núcleos grandes e proeminentes nucléolos, estes foram chamados de “gonócitos” (HOLSTEIN et al., 1978). Em fetos mais maduros (13 a 22 semanas), ambos os autores notaram algumas células germinativas com aspecto distinto dos gonócitos e sugeriram classificá-las como “espermatogônias fetais” (GASKELL et al., 2004).

Fetos humanos examinados entre 9 e 30 semanas de gestação reportaram três tipos de células germinativas morfológicamente distintas: gonócitos, células intermediárias e as espermatogônias fetais, as quais se acredita apresentarem diferenças em relação à pluripotencialidade celular (FUKUDA; HEDINGER; GROSCURTH, 1975). Em secções transversais dos testículos fetais humanos descritas no primeiro trimestre, foi fácil distinguir as células germinativas das células de Sertoli, devido ao grande e circular núcleo. Células germinativas apresentam-se com linha irregular, citoplasma claro e usualmente em grupos na periferia do órgão. Neste período o OCT-4 está imunolocalizado no núcleo da maioria das células germinativas (GASKELL et al., 2004).

Em embriões de camundongos, cerca de 50 células germinativas primordiais agrupam-se, podendo ser detectada na gastrulação em embriões 7-7,25 dias após o coito (dpc) no mesoderma extra-embrionário na base do saco amniótico (GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990). Enquanto, com 10 dpc, elas começam a se mover por atividade migratória acima do mesentério dorsal e dentro da parte superior das gônadas e, por volta do 12,5 dpc, elas diferenciam-se em oogônia/oócito e prospermatogônias, nos ovários e testículos, respectivamente (DE FELICI, 2000).

Culturas de células germinativas primordiais (PGCs) foram isoladas com pouco sucesso. O fato observado foi que as células germinativas isoladas das gônadas de embriões de camundongos, de diferentes idades, apresentaram diferentes habilidades de sobrevivência *in vitro*. Em particular, PGCs com 11,5 – 12,5 dpc não sobrevivem satisfatoriamente a 37°C. Todavia nesta temperatura cerca de 50% das PGCs sobreviveram por 2-3 dias e sofreram proliferação mitótica, promovendo a diferenciação celular (DE FELICI, 2000).

Diferentes marcadores celulares para células tronco pluripotentes, foram comparados e destacou-se que as células tronco embrionárias (ES), células embrionárias de carcinoma (EC) e células germinativas embrionárias (EG) apresentaram-se positivas para OCT-4, enquanto que para humanos apenas as ES e EC mostraram imunopositividade ao OCT-4, e as EG humanas apresentaram resultados inconclusivos (KURSCHSTEIN; SKIRBOLI, 2001).

Beltrami et al. (2007) em seus estudos obtiveram linhagens celulares de tecidos humanos adultos de fígado, coração e medula óssea, cujas culturas expressaram os fatores de transcrição de estágios específicos de

pluripotencialidade, tais como, OCT-4, NANOG e REX1. Diante desse resultado, concluíram que seu protocolo de geração de expansão celular provenientes de células de múltiplos órgãos, pode ser induzido á adquirir fatores morfológicos e funcionais de células maduras ainda que não seja embriologicamente relacionados ao tecido original.

Sagrinati et al. (2006) isolaram e caracterizaram células progenitoras multipotentes localizadas na cápsula de Bowman em rins adultos de humanos, e para comprovar que células epiteliais parietais da referida cápsula são células tronco, utilizaram-se do fator de transcrição OCT-4 em seus estudos. Nos seus resultados, são reveladas as existências de linhagens de células progenitoras multipotentes, em glomérulos de humanos adultos, fato este que abre novos horizontes para o desenvolvimento da medicina regenerativa.

Watson e Tam (2001) afirmam que durante o desenvolvimento de pré-implantação do embrião de camundongo, desde o blastocisto até a gastrulação, a regulação do OCT-4 é fortemente associada às primeiras linhagens de alocação dos tecidos somáticos e extra-embrionários. Também acusaram que existe persistência da atividade de OCT-4, mesmo após a diferenciação das células germinativas primordiais, o que confirma sua habilidade de produzir progênes, assim como as células tronco. Os achados das PGCs que podem ser induzidos de qualquer célula epiblastica e que dividem progenitores comuns a outras células somáticas evidenciam nesse estudo, a ausência de linhagem germinativa pré-determinado em embriões de camundongo.

A vimentina foi caracterizada como o principal filamento intermediário em fibroblastos de embrião de galinha. Apresenta-se como constituinte do citoesqueleto e do envelope nuclear de células derivadas do mesênquima, como é o caso das células endoteliais. A maior parte das células de origem mesenquimal ou não mesenquimal, e, também, células mantidas em cultura possuem filamentos de vimentina, que podem ser diferenciados imuno e bioquimicamente das outras classes dos filamentos intermediários (FRANKE et al., 1978). Os anticorpos anti-vimentina apresentam reação cruzada com células de mamíferos, aves e anfíbios, indicando que esta proteína foi bem conservada com a evolução. Entretanto, a vimentina de mamíferos e aves mostra algumas diferenças e podem ser produzidos anticorpos que não apresentem reações cruzadas (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996).

Alguns trabalhos mostraram que a vimentina e a desmina (componente do músculo esquelético e cardíaco de mamíferos e aves) coexistem, durante toda a miogênese, e enquanto a vimentina predomina em estágios iniciais a desmina passa a predominar em estágios mais tardios. Em algumas fases, a distribuição de vimentina e desmina é indistinguível, o que sugere que suas subunidades são capazes de formar copolímeros para originar um filamento. A variação dos níveis de vimentina e desmina no músculo adulto é uma importante característica que se relaciona com a capacidade funcional dos mesmos. Desta forma, os músculos esqueléticos dos mamíferos mostram, principalmente, a desmina como filamento intermediário, enquanto a vimentina é encontrada em pequenas quantidades ou está ausente (LAZARIDES, 1982).

O alto grau de insolubilidade da vimentina sugere a sua função estrutural no citoplasma. Algumas evidências bioquímicas e morfológicas indicam que os filamentos de vimentina estão associados à membrana nuclear e plasmática, mantendo a posição do núcleo e do fuso mitótico, durante a vida da célula. Durante a mitose, a vimentina sofre fosforilação do seu domínio amino terminal e se dispersa em agregados, contendo formas filamentosas (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996).

Terrace et al. (2007) caracterizaram e localizaram células progenitoras no fígado humano, e concluíram que as células tronco de fígado e os marcadores hematopoiéticos da mesma, sofreram co-expressão pelo marcador CD34 e por vimentina, marcador mesenquimal de linhagem restrita ao endotélio da veia porta.

Prelle, Holtz e Osborn (2001) estudaram a expressão dos filamentos intermediários, como a vimentina e queratina, em embriões suínos entre dia 7 e dia 11 após a concepção. A expressão da vimentina foi detectada no interior da massa celular dos embriões, nas células do epiblasto, as quais migraram entre o trofoblasto e as camadas subjacentes do hipoblasto. A queratina foi positiva no trofoectoderma das células em todas as fases. Estes resultados sugerem que a massa celular interna dos embriões suínos após 9 dias de concepção, começam a se diferenciar em células mesodérmicas.

A actina é uma proteína que, em conjunto com a miosina e moléculas de ATP, gera movimentos celulares e musculares. É a proteína intracelular mais abundante de uma célula eucariótica, sendo formada por subunidades globulares chamadas de actina G, que se polimerizam de forma helicoidal formando um filamento chamado de actina F. A mesma, em sua forma polimerizada forma os microfilamentos

importantes na composição do citoesqueleto. Estes filamentos estão presentes no citoplasma das células eucariotas sob a forma de feixes de filamentos paralelos ou redes de filamentos anastomosados com 5-7 nm de diâmetro (COOKE, 1976).

O modelo mais aceitável é o de um filamento helicoidal formado por uma cadeia simples de monómeros. Estes monómeros são constituídos por uma cadeia polipéptica de 374 (375 no músculo esquelético). A actina é o maior componente dos filamentos finos das células musculares e do sistema citoesquelético de células não musculares, e está presente em todos os eucariontes (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996).

O citoesqueleto de actina é dinâmico, sendo capaz de crescer e de encolher rapidamente. Primeiro ocorre à nucleação, que é a formação de um trímero estável, em seguida as subunidades são adicionadas em ambas às extremidades do filamento, crescendo mais rapidamente na extremidade positiva e despolarizando na extremidade negativa. A estabilização é controlada por proteínas especializadas de ligação da actina que estão no citosol (COOKE, 1976).

Os microfilamentos podem interagir com um grande número de outras estruturas e adquirir propriedades através de várias moléculas (actin binding proteins). Este grupo de proteínas pode ainda mediar a interação dos microfilamentos com outras estruturas celulares, nomeadamente membranas, ou funcionar como motores, agrupadas na família das miosinas (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996).

Aron (2006) em estudo demonstrou a finalidade de caracterizar as células tronco embrionárias caninas com uso de imunohistoquímica e outras colorações especiais, como o anticorpo alfa-actina. A autora afirmou que esse marcador é preconizado para identificação de células tronco em humano, roedores e primatas, e em tecidos adultos de cães. A alfa-actina segundo a autora, marca positivamente musculatura lisa e esquelética adulta e também toda região de mesoderma de corpos embrióides caninos. Segundo Sauer et al. (2000) corpos embrióides são o resultado da potencialidade de células tronco ao gerarem todas as camadas germinativas embrionárias e linhagens celulares durante o processo de diferenciação resultando em agregados celulares de formato esférico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os procedimentos utilizados para esta pesquisa estão subdivididos em:

4.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo sete espécimes de *Agouti paca*, sendo dois embriões e três fetos doados pelo pacário mantido no Setor de Animais Silvestres do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP (processo IBAMA 02154.002524/24-67) (Anexo A) e, dois doados do acervo de material biológico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

Para confirmação da prenhez foi realizada mediante sessões de ultrassonografia B, usando-se transdutor bifreqüencial setorial eletrônico de 5,0 e 7,5MHz em modo para visualização do embrião e/ou feto em desenvolvimento.

4.2 Colheita do Material

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Instituto de Obstetrícia e Reprodução do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Após obter o peso individual de cada animal (entre 5-10 kg) foi realizada a aplicação de tranqüilizantes, anestésicos, analgésicos e antibióticos, por via intramuscular (IM), no membro pélvico. A tranqüilização foi obtida através da aplicação de azaperone¹ na dose de 4mg/kg de peso corporal pela via (IM). Após dez minutos, foi aplicado 0,06 mg/kg de sulfato de atropina² pela via IM. A indução da anestesia foi obtida após 15 minutos da administração de sulfato

¹ Stresnil® - Jansen Pharmaceutica

² Sulfato de atropina® - Areston Ltda

de atropina na associação de cloridratos de quetamina³ (20mg/kg) e de xilazina⁴ (1,5mg/kg) para indução da anestesia. Após o tempo de latência observou-se o animal e o mesmo foi colocado em decúbito e iniciou-se na região abdominal ampla tricotomia utilizando lâmina de aço inoxidável. Seguido destes procedimentos, foi realizada a indução da anestesia geral com halotano⁵, por meio de máscara facial, juntamente com O₂ a 100%.

A incisão da pele foi feita na linha média, no sentido pré-retroumbilical, abrangendo cerca de 12 cm, devido ao considerável volume do corno uterino prenhe. O ovário foi identificado e, com o auxílio de duas pinças hemostática colocadas no pedículo ovariano a um centímetro uma da outra, foi mantido suspenso e exteriorizado mediante incisão, procedendo-se, então, a sua ligadura. Duas outras pinças, iguais às anteriores, foram colocadas na porção inicial do corno uterino prenhe, incidindo-se entre as mesmas e removendo-se o corno em questão. Suturas tipo Schmieden (primeiro plano) e tipo Cushing (segundo plano), foram realizadas no útero, colocando-se o epíplon sobre a mesma ao final desse procedimento. A camada muscular foi suturada, utilizando-se ponto em X. Nas suturas do pedículo ovariano, do útero e da camada muscular, o fio categut⁶ número 2 e, na sutura da pele, foi utilizado fio de náilon monofilamento número 0.

Imediatamente, após a cirurgia, foi realizado curativo local com solução de iodo a 2%, colocando esparadrapo⁷ hipoalergênico sobre a sutura de pele, aplicando antibiótico⁸ (15.000U/kg de benzilpenicilina benzatina, 7.500U/kg de benzilpenicilina procaína, 7.500U/kg de benzilpenicilina potássica, 6,25mg/kg de diidroestreptomicina e 6,25mg/kg de sulfato de estreptomicina). Para prevenir uma possível contaminação e para o controle analgésico, foi utilizado sulfato de buprenorfina⁹ na dose de 0,02mg/kg. Depois de 48 horas, outra dose dos antibióticos foi administrada e o esparadrapo mantido até a retirada dos pontos da pele, ocorrida após sete dias de cirurgia (OLIVEIRA et al.,2003; BONATELLI, 2005).

Após a colheita do material, os fetos e embriões foram transferidos para o CECRIMPAS – Centro de Criação, Multiplicação e Pesquisa em Animais Silvestres

³ Ketamina 50® - Holliday – Scott S.A.

⁴ Coopazine® - Coopers Brasil Ltda.

⁵ Halotano® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

⁶ Ethicon® - Ltda.

⁷ Micropore® - 3M do Brasil Ltda

⁸ Pentabiótico Veterinário® - Fort Dodge saúde Animal Ltda.

⁹ Timgesia® - Schering – Plough Ltda.

do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos – UNIFEOB (processo IBAMA 02027.02297/2005-98, registro 579888) (Anexo B), sendo fixados em solução de formaldeído 10% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 para posterior descrição dos resultados.

4.3 Dados Biométricos

Após a coleta, os fetos e embriões foram pesados em uma balança analítica e mensurados com auxílio de um paquímetro de aço inoxidável, o qual se obteve através da metodologia preconizada por Evans e Sack (1973); Noden e Lahunta (1990) com mensurações da distancia occípito-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nugal numa extremidade e da ultima vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump / CR).

4.4 Análise Macroscópica

Os fetos e embriões após serem mensurados e fixados, seguiram-se sua descrição morfológica externa mediante observação das estruturas presentes no corpo do animal.

A nomenclatura utilizada será referida conforme a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1992) e a *Nomina Embryologica Veterinaria* (1994).

4.5 Análise Microscópica

Para o estudo histológico foram utilizados dois embriões de paca, os quais já se encontrava fixado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Em seguida o material foi desidratado em uma série de etanóis em

concentrações crescentes (de 70 a 100%), diafanizado em xilol, seguido de embebição em similar de parafina (Histosec®).

O bloco foi submetido a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de aproximadamente 5µm. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C.

Os cortes, após serem desparafinizados foram corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina – HE, Azul de toluidina, Tricrômio de Masson e Reação histoquímica de P.A.S. (ácido periódico de Schiff), com fundo de hematoxilina (TOLOSA et al., 2003).

O material processado e corado foi analisado e as características morfológicas encontradas foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

4.6 Processamento do material para imunohistoquímica para detecção de Oct-4, vimentina e actina de músculo liso

Para a realização do protocolo imunohistoquímico foram utilizados os mesmos embriões usados para histologia convencional, os quais já se encontravam fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

Os embriões inicialmente passaram pelo processo de parafinização e em seguida os blocos foram cortados (5µm) e colocados em lâminas previamente silanizadas, (3-aminopropyltriethoxy-silane) Sigma® (A 3648-100) com dois cortes por lâmina sendo um, para controle. Os mesmos foram processados rotineiramente através das técnicas de inclusão em parafina (TOLOSA et al., 2003). Os cortes seqüenciais foram cortados da região lateral para mediana.

O protocolo utilizado para esta técnica foi fornecido por Morten Vejlsted, doutorando do Departamento de Ciências Básicas Animal e Veterinária da Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. O mesmo protocolo foi utilizado para marcação de vimentina, anti-vimentina policlonal de cabra (cód. SC-1226, Santa Cruz Biotechnology, USA) e actina de músculo liso anti-humano (clone 1A4, M0851, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), diferenciando apenas no primeiro anticorpo. O protocolo utilizado segue abaixo:

Protocolo imunohistoquímico para detecção de Oct-4	
1 Desidratação	5 Bloqueio da Proteína
Álcool 70° – 60 min (ou over night)	Proteína DAKO ¹⁰ - 10 min
Álcool 96° - 60 min	6 Anticorpo primário
Álcool 99° - 60 min	Ac primário policlonal Oct-4 ¹¹ (1:500, em BSA/PBS) – 120 min
Xilol I – 20 min	Para o controle negativo (PBS) - 120 min
Xilol II – 20 min	Pepítido de pré- absorção com Oct-4 ¹² - over night
Xilol III – 60 min	PBS - 2 x 3 minutos
Parafina I – 60 min	7 Anticorpo secundário ¹³
Parafina II – 60 min	a - Anticorpo (frasco amarelo) - 15 min
Parafina III – 60 min (ou over night) – 60°C	b - PBS - 2 X 3 min
2 Montagem dos blocos	c - Estreptovidina (frasco vermelho) - 15 min
Cortes de 5 µm - lâminas silanizadas	d - PBS - 2 X 3 min
Cortes em banho-maria sem gelatina	8 Revelador ¹⁴
3 Rehidratação	1 gota de A em 1ml de água destilada, mistura e 1 gota de B e C e mistura
Xilol - 2 x 5 min	Descanso - 30 min
Álcool 99% - 2 x 5 min	Água destilada - 5 min
3% H ₂ O ₂ em álcool 99% - 5 min	Hematoxilina - 30 seg
Álcool 99% - 5 min	Água corrente - 5 min
Álcool 96% - 5 min	Água destilada - 1 min
Álcool 70% - 5 min	9 Montagem
Água destilada - 5 min	Colar as lamínulas com glicergel.
4 Tampão	
Tampão citrato de sódio 0,01M (ph6,0) - 3 x 5 min (microondas 720W)	
Tempo descanso - 20 min	
Água destilada - 5 min	
PBS - 2 x 5 min	

¹⁰ DAKO protein block – x0909

¹¹ Policlonal cabra anti-human Oct-4 – Santa Cruz

¹² Pepitideo de pré- absorção com Oct-4 – Santa Cruz

¹³ DAKO LSAB + Kit Peroxidase – K0690

¹⁴ Kit AEC Zymed – 00-2007

5 RESULTADOS

Os resultados a seguir referem-se às obtenções das características macroscópicas externas dos fetos e dos embriões de paca, bem como a caracterização da placenta de paca em início de gestação, as características histológicas dos embriões e a imunolocalização com OCT-4, vimentina e actina para músculo liso.

5.1 Análise dos Fetos e Embriões

Os resultados foram obtidos a partir das seguintes análises:

5.1.1 Análise Macroscópica

Foram analisados no presente estudo, cinco fetos e dois embriões de *Agouti paca*, em diferentes idades gestacionais (Figura 1A e B, respectivamente). A tabela 1 esboça o Crow-Rump (mensuração occípito-sacral) juntamente com o peso dos animais coletados.

Tabela 1 - Mensuração occípito-sacral (Crow-Rump) e peso (g) dos animais – São Paulo - 2007

Animal	Crow-Rump (cm)	Peso (g)
Feto 1 (FMVZ)	5,7 cm	32,3g
Feto 2 (FMVZ)	6,8 cm	52,3g
Feto 3 (UNESP)	9,6 cm	102,2g
Feto 4 (UNESP)	10,5 cm	143,7g
Feto 5 (UNESP)	15,5 cm	364g
Embrião 1 (UNESP)	1,8 cm	0.887g
Embrião 2 (UNESP)	1,2 cm	0.176g

Figura 1A – Fotografia em vista lateral dos fetos coletados de *Agouti paca* em diferentes períodos gestacionais. Barra: 1 cm

Figura 1B – Fotografia em vista lateral dos embriões de paca. Barra: 1 cm

Os fetos 1 e 2, com 5,7 e 6,8 cm de Crow-Rump, respectivamente, apresentaram como características morfológicas visíveis: imaturidade facial acentuada, esta incluía, os olhos apresentavam-se recobertos por uma lente proeminente e, estavam circundados por protuberâncias palpebrais (*plecae palpebrales*), os lóbulos das orelhas (*tubercula auricularia*) apresentavam-se com pouco desenvolvimento e, estão localizados em ambos os lados craniais; e encontram-se na borda da área cervical e está abaixo das vesículas ópticas. A boca apresentava uma pequena abertura, o qual se pode observar a formação dos dentes incisivos. Os membros torácicos e pélvicos apresentavam um grau equalitário de desenvolvimento (Figuras 2 e 3).

Figuras 2 e 3 – Fotografia em vista lateral dos fetos de *Agouti paca*. Observar os fetos com as características morfológicas visíveis. Barra: 1 cm

Os fetos 3 e 4, com 9,6 e 10,5 cm de Crow-Rump, respectivamente, mostravam-se com as seguintes características: orelhas bem desenvolvidas, os membros torácicos e pélvicos encontravam-se em estágio de desenvolvimento (relacionado ao tamanho) em grau equalitário, ainda como estruturas presentes nos

membros, pode-se observar a presença de garras em ambos os membros e desenvolvimento das características faciais, como, presença de vibrissas ao redor das bordas nasais, os olhos ainda continuam protegidos por uma lente proeminente e a boca continua em estágio intermediário de desenvolvimento os dentes incisivos (Figuras 4 e 5).

Figuras 4 e 5 - Fotografia em vista lateral dos fetos de *Agouti paca*. Observar em ambas as fotos à presença de garras nos membros torácicos e pélvicos (seta vermelha), a presença de vibrissas ao redor das bordas nasais (circulo) e notar as orelhas bem desenvolvidas (seta azul). Barra: 1 cm

Em um detalhe do feto 5, podemos notar a presença dos pêlos táteis bem visíveis, tanto ao redor das bordas nasais como também próximos aos olhos (Figura 6).

Figura 6 - Fotografia em vista lateral do feto de *Agouti paca*. Observar em detalhe à presença de vibrissas ao redor das bordas nasais e próximo aos olhos (setas). Barra: 1 cm

O feto 5, com 15,5 cm de Crow-Rump apresentou como característica marcante, a presença pêlos distribuídos por todo o corpo, fato este que corrobora, por ser um feto de final de gestação; membros torácicos e pélvicos em grau equalitário de desenvolvimento, com presença de garras, desenvolvimento das características faciais, tais como à presença de vibrissas, olhos proeminentes e orelhas bem desenvolvidas e a boca continha os dentes incisivos em estágio avançado de desenvolvimento (Figura 7).

Figura 7 – Fotografia em vista lateral do feto de *Agouti paca*. Notar a presença dos pêlos e manchas características da espécie, orelhas bem desenvolvidas (seta azul), presença de garras (seta verde) e olhos bem desenvolvidos (seta fina). Barra: 1 cm

Em todos os fetos estudados, pode-se observar o tubérculo genital e o aro anal na região perineal (Figura 8).

Figura 8 – Fotografia em decúbito dorsal de um dos fetos de *Agouti paca*. Notar o tubérculo genital (circulo pontilhado) e o aro anal na região perineal (seta). Barra: 1 cm

Após os procedimentos cirúrgicos, o corno gestante foi exposto para remoção da placenta. Este apresentou-se sustentado pelo mesométrio e vascularizado por ramos da artéria uterina, o qual se ramificava de forma semi-penada antes de penetrar na parede do útero (Figura 9 A e B).

O útero prenhe mostrou-se com um aumento de volume em área determinada e, a abertura na face antimesometrial do mesmo, nos permitiu visualizar uma formação ovalada inserida na face mesometrial da parede uterina. Essa formação caracterizou-se ser uma placenta isolada (Figura 9 C).

Seguido de incisão na face antimesometrial, notamos internamente a decídua capsular voltada para a luz uterina (Figura 9 D).

A placenta vitelínica visceral, a primeira membrana placentária, apresentou-se por ser uma membrana fina e transparente com vasos sangüíneos evidentes distribuídos por toda sua superfície, os vasos vitelínicos (Figura 9 E).

A seguir, observamos uma massa de coloração avermelhada em formato de cálice, a qual estava voltada para a face mesometrial do útero, a placenta principal. Estruturalmente, era composta por lóbulos e áreas entre estes, denominadas de interlóbulos. A placenta vitelínica parietal projetava-se sobre a superfície da placenta principal (Figura 9 F).

A placenta vitelínica visceral, em seguida, foi seccionada para visualização do âmnio, uma membrana fina e transparente que se encontrava ao redor do embrião, o qual estava conectado através do cordão umbilical (Figura 9 G e H).

Pudemos visualizar uma área esbranquiçada, que mantinha contato no sentido mesometrial, a decídua basal, que continuava pela parede uterina. A mesma podia ser facilmente removida do restante do útero e estava conectada por vasos sangüíneos.

Figura 9 – Fotografias da coleta da placenta de *Agouti paca*. Em A, notar a disposição anatômica das estruturas do sistema reprodutor: ovário (circulo pontilhado), corno uterino não gestante (seta) e corno uterino gestante com a placenta (*). Em B, podemos visualizar a disposição dos ramos da artéria uterina penetrando na parede do útero (setas). Em C, notar a disposição de forma semi-penada dos vasos penetrando na parede uterina (seta dupla) e o corno gestante evidenciando o formato ovalado (*). Em D, visualizar a decídua capsular (seta larga) e a decídua basal (*) além do útero invertido (seta fina). Em E, notar a placenta vitelínica visceral (seta larga), a decídua capsular (dec) e os vasos vitelínicos (seta fina). Em F, observar a placenta principal de cor avermelhada e projetada a mesma, a placenta vitelínica parietal (seta). Em G, observar o âmnio ao redor do embrião (seta). Em H, notar os lóbulos placentários (*) e o cordão umbilical (seta). Barra: 1 cm.

O embrião 1, com Crow-Rump de 1,8 cm, apresentou na região cervical as vesículas encefálicas em desenvolvimento (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo). Pode-se visualizar a vesícula óptica com pigmentação da retina, além do quarto ventrículo encefálico e uma curvatura cervical acentuada. O broto dos membros encontrava-se em desenvolvimento, mas com uma pequena distinção dos dígitos, os quais se encontravam recobertos por uma membrana interdigitante. Notamos ainda, a presença do cordão umbilical, bem como a visualização da vesícula ótica em desenvolvimento e da fosseta nasal (Figura 10).

Figura 10 - Fotografia do embrião de paca, em vista lateral, apresentando 1,8 cm de CR. Observar as estruturas em A e B: Vesícula óptica com pigmentação (1), Prosencéfalo (2), Mesencéfalo (3), Quarto ventrículo encefálico (4), Flexura cervical (5), Membro torácico (6), Cordão umbilical (7), Membro pélvico (8), Local da fosseta nasal (9) e Vesícula ótica (10). Barra: 1 cm

Pudemos ainda no embrião 1, após ser diafanizado, visualizar a presença do coração e fígado, os quais se encontravam na cavidade torácica e abdominal, respectivamente, bem como a vascularização da cabeça e do esboço da coluna

vertebral. Notamos ainda a presença do pedículo umbilical, o qual é composto pelo intestino, veias e artérias. (Figura 11).

Figura 11 - Fotografia do embrião de paca após diafanização, em vista lateral, apresentando 1,8 cm de CR. Observar as estruturas embriológicas em A e B: Fígado (1), Vascularização da coluna vertebral (2), Vascularização da cabeça (3), Coração (4) e Pedículo umbilical (5). Barra: 1 cm

O embrião 2, com Crow-Rump de 1,2 cm, pode-se observar a divisão dos arcos branquiais, além dos sulcos que o divide, não havendo ainda fechamento do neuróporo cranial. Notamos ainda, a curvatura cranial acentuada e os somitos delimitados e individualizados. O broto dos membros apresentava-se em desenvolvimento, os quais possuíam o formato de “remo”.

Na região cervical, notamos a presença da área cardíaca e fígado, ventralmente a esta. Na região caudal do embrião pode-se visualizar a curvatura crânio-caudal, permitindo ao mesmo uma posição em forma de “C”. Ainda no embrião, pudemos visualizar a vesícula óptica sem pigmentação da retina, a abertura do tubo neural na região do quarto ventrículo encefálico em desenvolvimento, a fosseta nasal e o rombencéfalo e mesencéfalo em desenvolvimento (Figura 12).

Figura 12 - Fotografia do embrião de paca, em vista lateral, apresentando 1,2 cm de CR.- Observar as estruturas em A e B: Vesícula óptica sem pigmentação (1), Mesencéfalo (2), Flexura cervical (3), Coração (4), Broto do membro torácico com formato semelhante a um remo (5), Fígado (6), Broto do membro pélvico (7), Local da fosseta nasal (8), Arcos Branquiais (9), Prosencéfalo (10), Abertura do tubo neural na região do quarto ventrículo encefálico (11), Vasos sanguíneos (12) e Somitos (13). Barra: 1 cm

5.1.2 Análise Microscópica

O embrião 1 e 2, com Crow-Rump de 1,8 cm e 1,2 cm, respectivamente, apresentaram, aos cortes histológicos, algumas estruturas importantes tais como a medula espinhal, abertura do 4º ventrículo encefálico, presença das vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), a coluna vertebral, a hipófise, cavidade oral, cavidade nasal, olho, coração com divisão atrial e ventricular, pulmão, diafragma que já torna possíveis às divisões em cavidade torácica e abdominal, não mais chamando essa cavidade de celoma. Vemos também a crista metanéfrica e mesonéfrica e o fígado, bem como o intestino e pedículo umbilical. Notamos ainda o broto do membro torácico e a cauda (Figura 13 A e B).

Figura 13 A – Fotomicrografia do embrião 1, com Crow-Rump de 1,8 cm. Coloração Azul de toluidina e Hematoxilina-Eosina - HE

Figura 13 B – Fotomicrografia do embrião 2, com Crow-Rump de 1,2 cm. Coloração Hematoxilina-Eosina - HE

Após análise minuciosa, averiguamos suas estruturas histológicas em partes, para melhor entendermos a descrição dos resultados.

O desenvolvimento do sistema nervoso ocorre pela placa neural, uma área espessada do ectoderma embrionário, em forma de chinelo. Em nossos resultados, observamos a formação das três vesículas encefálicas primárias (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) em ambos os embriões com CR 1,2 e 1,8 cm, embriões 2 e 1 respectivamente. Pudemos notar a presença do 4º ventrículo encefálico, o qual se encontrava aberto, além do desenvolvimento da medula espinhal (Figura 14 A).

A medula espinhal, originada da porção do tubo neural caudal, mostrou-se composta por um espesso neuroepitélio. Abaixo desse neuroepitélio, notamos uma camada de tecido conjuntivo frouxo, que entremeado a este, observamos a formação da coluna vertebral, constituída de tecido cartilaginoso em diferenciação, além do tecido fibrocartilaginoso com fibras colágenas e elásticas entremeadas ao redor dos discos vertebrais. Pudemos notar ainda circundando o tubo neural o mesênquima, que futuramente irá formar a denominada meninge primitiva, uma membrana, que na sua parte externa se espessa, para formar a dura-máter, e a sua parte interna permanece delgada e forma a pia – aracnóide composta pela pia-máter e aracnóide (Figura 14 B).

Figura 14 – Fotomicrografia do sistema nervoso do embrião de paca com CR 1,8 cm. Em A visualizamos as três vesículas encefálicas: prosencéfalo (P), mesencéfalo (M) e rombencéfalo (R); em detalhe o 4º ventrículo encefálico (*). Hematoxilina-Eosina. Em B, notamos na medula espinhal com seu neuroepitélio (seta dupla); tecido conjuntivo (Tc); epiderme (Ep); coluna vertebral com formação de cartilagem (C); meninges primitivas (Mp) e tecido fibrocartilaginoso (Tf). Tricrômio de Masson

O aparelho respiratório “inferior” se relaciona com a porção anterior do intestino primitivo. Nos resultados expostos, notamos a formação do tubo laringotraqueal, o qual se apóia no mesênquima. Observamos também a prega traqueoesofágica que delimita a traquéia do esôfago, sendo que ambos os tubos encontram-se ligados à região dorsal do embrião, pelo mesentério dorsal (Figura 15 A).

A traquéia mostrou-se como tubo longo ate adentrar nos pulmões, o mesmo apresenta zonas de cartilagem e tecido conjuntivo, além do epitélio de revestimento (Figura 15 A).

O brônquio traqueal, foi observado no embrião 1 e 2, o qual através de cortes consecutivos, observamos a presença da traquéia, seguido da bifurcação da mesma originando os brônquios principais. Pudemos notar que dos brônquios principais, partiam as formações dos brônquios secundários, e destes partiam ramos, lobares e segmentares (Figura 15 B, C).

No embrião 1 com CR 1,8 cm notamos que cada brônquio lobar era constituído por epitélio apresentando várias camadas de células, apoiado em mesênquima, tecido conjuntivo embrionário. Observamos que em ambos os embriões 1 e 2, os pulmões apresentavam-se na fase pseudoglandular, com subdivisões dos lobos pulmonares em cranial e caudal, juntamente de suas ramificações partindo de um brônquio principal (Figura 15 C, D).

Figura 15 A e B – Fotomicrografia do aparelho respiratório “inferior” do embrião de paca com CR 1,2 e 1,8 cm. Em A e B, visualizamos o tubo laringotraqueal (circulo); prega traqueoesofágica (seta); traquéia (T); esôfago (E); mesentério dorsal (Md); pulmão (P); brônquio traqueal (Bt); brônquio principal (Bp); brônquio secundário (Bs); ramo lobar (BI); local de divisão dos lobos pulmonares (*). A: Coloração Tricrômio de Masson; B: Hematoxilina-Eosina

Figura 15 C e D – Fotomicrografia do aparelho respiratório “inferior” do embrião de paca com CR 1,2 e 1,8 cm. Em C e D, visualizamos o ramo lobar (Bl); epitélio (E); capilares (C); brônquio principal (Bp); mesênquima (M). Coloração: Hematoxilina-Eosina

O sistema digestório provém do intestino primitivo que se fecha na sua extremidade cranial pela membrana orofaríngea e na sua extremidade caudal pela membrana cloacal. Em nossos resultados, observamos o esôfago, que é parte do intestino anterior, como um tubo dorsal ao embrião, o qual se encontra apoiado ao mesentério dorsal, formado por mesênquima, além do seu epitélio tomando a luz do tubo (Figura 16 A).

O estômago, porção final do intestino anterior, apresentou-se com uma dilatação e com seu epitélio característico, bem como o tecido conjuntivo embrionário envolvendo o órgão. O mesmo encontrava-se na cavidade abdominal do embrião, apoiado sobre mesênquima (Figura 16 B).

O fígado, originado da porção caudal do intestino anterior, se desenvolve a partir de duas populações celulares do endoderma. Nos resultados expostos, o órgão apresenta-se grande, ocupando a maior parte da cavidade abdominal. Visualizamos ainda veias centro lobulares espalhadas em todo parênquima hepático, bem como a presença dos cordões de hepatócitos começando a se organizar e também os sinusóides hepáticos (Figura 16 C).

O intestino apresentou-se com varias secções tubulares nos embriões, estas apresentavam um epitélio colunar alto estratificado em formação, presença de células caliciformes, um mesênquima em diferenciação, além do PAS positivo demonstrando presença de glicoproteínas nos túbulos. Notamos também no pedículo umbilical a presença de secções tubulares do intestino, vasos e capilares, além do âmnio com seu epitélio simples pavimentoso e tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas (Figura 16 D, E e F).

Figura 16 A e B – Fotomicrografia do sistema digestório do embrião de paca com CR 1,2 e 1,8 cm. Em A, notamos o esôfago (E); epitélio tomando toda a luz (*); mesentério dorsal (Md). Coloração: Tricrômio de Masson. Em B, visualizamos o estômago (Et); epitélio (seta); tecido conjuntivo embrionário (Tc); cavidade abdominal (Ca). Coloração: Hematoxilina-eosina. Barra: 500μm

Figura 16 C, D e E – Fotomicrografia dos órgãos do sistema digestório do embrião de paca com CR 1,2 e 1,8 cm. Em C, notamos o fígado com o parênquima hepático (círculo); veia centro lobular (V); cordões de hepatócitos (setas); sinusóides hepáticos (*). Coloração: Hematoxilina-eosina. Em D, visualizamos um túbulo do intestino com seu epitélio (Ep); mesênquima (M); células caliciformes (setas). Coloração: Hematoxilina-eosina. Em E, notamos um túbulo do intestino marcado com PAS, evidenciando positividade para glicoproteínas; epitélio (Ep); mesênquima (M). Coloração: Reação histoquímica de P.A.S

Figura 16 F – Fotomicrografia do sistema digestório do embrião de paca com CR 1,2 e 1,8 cm. Notar o pedículo umbilical com as seguintes estruturas: túbulo intestinal (Ti); artéria (A); veia (V); âmnio (Am); capilar (C). Coloração: Tricrômio de Masson

O sistema urinário desenvolve-se a partir do mesoderma intermediário, que se estende ao longo da parede dorsal do corpo do embrião. Em nossos resultados, observamos o embrião 1 com CR 1,8 cm a crista metanéfrica, primórdio dos rins permanentes, com alguns glomérulos e túbulos renais. No embrião 2 com CR 1,2 cm, visualizamos uma massa do mesonefro, o rim provisório, e uma outra massa metanéfrica, ambas com glomérulos e túbulos renais constituintes (Figura 17 A e B).

Figura 17 – Fotomicrografia do sistema urinário do embrião de paca com CR 1,8 e 1,2 cm. Em A crista metanéfrica e em B crista mesonéfrica, evidenciando as estruturas: glomérulo (G), cápsula de Bowman (CB); espaço subcapsular (Es); túbulos renais (Tr e círculo); Parênquima renal (Pr); área de vascularização (seta). Coloração: Hematoxilina-eosina

O sistema cardiovascular é o primeiro sistema importante a funcionar no embrião. Nos resultados expostos, o coração apresentou-se característicos com as câmaras cardíacas, átrio e ventrículo, bem como a aorta dorsal saindo do coração.

Visualizamos ainda as camadas histológicas do coração: epicárdio, miocárdio e endocárdio (Figura 18 A, B e C).

Figura 18 – Fotomicrografia do sistema cardiovascular do embrião de pacu com CR 1,8 e 1,2 cm. Em A, visualizar as camadas do coração: epicárdio (Ep); endocárdio (En); miocárdio (M). Coloração: Tricrômo de Masson. Em B, detalhe de A, mostrando as camadas cardíacas e vasos (V). Em C, notar a aorta dorsal saindo do coração (Ad); ventrículo (V); átrio (A). Coloração: Hematoxilina-eosina

5.2 Imunohistoquímica para detecção de Oct-4, vimentina e actina de músculo liso

Determinamos a imunomarcação por meio de anticorpos específicos, Oct-4, vimentina e actina, os quais detectaram as linhagens primitivas celulares (células germinativas), mesênquima, endotélio e parede de vasos sanguíneos e musculatura, nos tecidos localizados nos órgãos: pulmões, coração, intestino, somitos, fígado e rim (Tabela 2).

Tabela 2 – Órgãos e marcadores utilizados para detecção de células germinativas e componentes celulares – São Paulo – 2007

Órgãos	Oct-4	Vimentina	Actina
Pulmão	-	+	+
Coração	levemente +	+	+
Intestino	-	+	+
Somitos	-	+	-
Fígado	++	+	+
Rim (cristas meso e metanéfrica)	+	+	+

O Oct-4 não foi expressivo no pulmão (Figura 19B), enquanto, que a actina de músculo liso, sua positividade foi visualizada nos primórdios dos brônquios, onde possivelmente estão localizados vasos sanguíneos (Figura 19C). A marcação de vimentina apresentou imunopositividade para o mesênquima pulmonar ao redor dos brônquios, bem como para os capilares que nutrem a região epitelial do brônquio (Figura 19D).

No coração, o Oct-4 apresentou-se levemente positivo para as células localizadas no miocárdio (Figura 20B) e tornou-se bem evidenciado quando utilizamos actina para imunomarcação (Figura 20C). A marcação para vimentina, foi visualizada no mesênquima cardíaco e nos micro-vasos existentes na região (Figura 20D).

No intestino, o Oct-4 apresentou imunomarcacão negativa em todo o tecido mapeado (Figura 21B). Todavia, para actina de músculo liso, notamos imunopositividade na musculatura que envolve cada túbulo intestinal, como também nos vasos que suprem este rgo (Figura 21C), enquanto que a vimentina expressou positividade em todo o mesênquima ao redor dos túbulos intestinais e também nos capilares sangneos (Figura 21D).

Nos somitos, tanto o Oct-4 quanto a actina apresentaram-se inexpressivos para as regiões de mesênquima e cartilagem para a formao das vértebras (Figura 22B e C), enquanto que a vimentina apresentou imunomarcacão positiva nos primórdios da cartilagem, e no mesênquima envolvendo esta região (Figura 22D).

O fígado mostrou-se imunopositivo aos 3 marcadores, sendo que o Oct-4 evidenciou as células dos cordões hepáticos (Figura 23B), enquanto que a actina e a vimentina indicou marcao no mesênquima hepático, endotélio dos sinusóides e vasos (Figura 23C e D), destacamos ainda a imunopositividade do tecido conjuntivo que reveste o rgo (Figura 23D).

No rim, formados pelas cristas meso e metanéfrica, pudemos visualizar a imunopositividade do Oct-4 no túbulo renal e também no seu mesênquima constituinte (Figura 24B). A imunomarcacão para actina foi positiva nas células do mesênquima renal, assim como nos glomérulos, os quais são constituídos de capilares sinusóides (Figura 24C), enquanto que a imunopositividade para vimentina ocorreu no mesênquima renal, bem como nos capilares que nutrem a região (Figura 24D).

Figura 19 – Fotomicrografias do sistema respiratório “inferior”. Em A (controle), visualizamos o brônquio principal (Bp) e o lobar (Bl), mesênquima (M) e áreas de vascularização (setas). Em B, notamos a reação de imunomarcacão com Oct-4 negativa, ilustrando um brônquio lobar (Bl) e o mesênquima (M). Em C, notamos a imunopositividade a actina nas áreas de músculo (setas) ao redor do brônquio principal (Bp). Em D, visualizar a imunopositividade para vimentina no mesênquima (M) circundando o brônquio principal (Bp) e os capilares (*) na base do brônquio. Barra B= 100µm, C= 40µm e D= 40µm

Figura 20 – Fotomicrografias do coração. Em A (controle), visualizamos o miocárdio (Mio), em B, notamos a reação de imunomarcacão com Oct-4 levemente positiva nas células (setas) do miocárdio. Em C, notamos a imunopositividade a actina no miocárdio (Mio) e nos vasos presentes na musculatura (setas) e em D, visualizar a imunopositividade para vimentina no mesênquima (M) e nos capilares (setas). Barra B= 40µm, C= 40µm e D= 40µm

Figura 21 – Fotomicrografias do intestino. Em A (controle), visualizamos um túbulo intestinal com seu epitélio (Ep) e mesênquima (M), em B, notamos a reação de imunomarcacão com Oct-4 negativa, ilustrando um túbulo intestinal com seu epitélio (Ep) e o mesênquima (M). Em C, notamos a imunopositividade a actina nas áreas de músculo (setas) ao redor do túbulo intestinal e em D, visualizar a imunopositividade para vimentina no mesênquima (circulo) circundando o túbulo intestinal encontramos os capilares (setas) na base do túbulo. Barra B= 40µm, C= 20µm e D= 40µm

Figura 22 – Fotomicrografias do somito. Em A (controle), visualizamos os somitos (S), em B, notamos a reação de imunomarcção com Oct-4 negativa, ilustrando a zona de cartilagem (C) do somito e o mesênquima (M). Em C, notamos a marcação para actina negativa nos somitos (S) e em D, visualizar a imunopositividade para vimentina na zona de cartilagem (circulo) do somito e o mesênquima (M) evidenciando os capilares presentes. Barra B= 40µm, C= 100µm e D= 40µm

Figura 23 – Fotomicrografias do fígado. Em A (controle), visualizamos o mesênquima hepático (M) e a veia centro lobular (seta), em B, notamos a reação de imunomarcção com Oct-4 positiva, ilustrando as células de hepáticos (circulo). Em C, notamos a imunopositividade a actina nas áreas de músculo (seta) na veia centro lobular, nos capilares sinusóides (cabeça de seta) e no tecido conjuntivo (seta grossa) revestindo o órgão e em D, visualizar a imunopositividade para vimentina no mesênquima (M) e no endotélio (seta) da veia centro lobular e nos capilares (cabeça de seta). Barra B= 40µm, C= 40µm e D= 20µm

Figura 24 – Fotomicrografia da crista metanéfrica do rim. Em A (controle), visualizamos o mesênquima renal (M), glomérulo (seta) e túbulos renais (circulo), em B, notamos a reação de imunomarcção com Oct-4 positiva, ilustrando um túbulo renal (seta) e o mesênquima (*). Em C, notamos a imunopositividade a actina nas células do mesênquima renal (circulo) e nos glomérulos (G) que contem capilares e em D, visualizar a imunopositividade para vimentina no mesênquima (M) circundando o túbulo renal e os capilares (seta) na base do túbulo. Barra B= 40μm, C= 40μm e D= 40μm

6. DISCUSSÃO

A embriogênese de algumas espécies esta correlacionada com uma série de mudanças contínuas, de uma maneira similar a que ocorre no desenvolvimento pré-natal nas diferentes espécies (KNOSPE, 2002; BEAUDOIN et al., 2003). Apesar de aceitas similaridades, existe um número de sistemas de classificação de embriões.

Felipe et al.. (2006), em experimento com fetos de 60 dias de gestação de *Myocastor coypus*, cita que, por exemplo, a Nomina Embryologica Veterinária (1994) estabelece 15 estágios de desenvolvimento; o sistema Carnegie nomeia 23 estágios; o sistema Theiler (1972) considera 27 estágios para ratos e Dyban et al. (1975) estabelece 27 estágios para roedores murinos e coelhos de laboratório. Em geral, a descrição do desenvolvimento embrionário e fetal em outras espécies foi baseada em estágios construídos através da idade, mudanças corporais por diferenciação gradual, aumento do tamanho do corpo e peso, e desenvolvimento total de sistemas e órgãos (THEILER, 1972; KNOSPE, 2002; BEAUDOIN et al., 2003).

Mondolfi (1972) em estudo com *Agouti paca*, relata que os animais apresentaram os olhos protuberantes e estes se localizavam relativamente altos no plano frontal; dos dois lados do focinho se inserem pêlos táteis, largos e sedosos, dirigidos para trás; outro conjunto de pêlos mais curto e delgado inseria-se na região temporal, abaixo e a frente dos ouvidos, denominadas vibrissas, tais achados assemelham-se aos fetos de paca usados para pesquisa.

Moore e Persaud (2004) ao estudarem fetos humanos, relatam que os mesmos esboçam os membros já distintos e divididos em segmentos, o orifício bucal já está separado das fossas nasais e os olhos são bem visíveis, pois ainda não há pálpebras, corroborando assim com nossos resultados.

Evans e Sack (1973), ao estudar a embriogênese do *Guinea pig*, relatam que fetos aos 31 dias de gestação, apresentaram presença de um plano nasal evidente, os dígitos encontravam-se separados e os membros apresentavam em grau equalitário de desenvolvimento, fato este corroborado com nossos estudos.

Como descrito por Butler e Juurlink (1987) para humanos, os fetos de *Agouti paca* apresentaram as características morfológicas semelhantes ao estágio 23 de Carnegie, o qual cita a presença da separação dos dígitos, presença da aurícula da orelha externa bem desenvolvida e olhos proeminentes.

Baseado nas características morfológicas externas, segundo Felipe et al. (2006) para fetos de 60 dias de gestação de *Myocastor coypus*, quando comparados com os fetos de *Agouti paca*, as características aparecem com base nas similaridades do desenvolvimento dos membros (presença de dígitos nos membros torácicos) e sua posição (em direção a linha ventromedial e com uma pequena separação entre eles); marcado em relevo das pálpebras e presença precoce dos lóbulos da orelha.

Em nossos estudos, os fetos de paca assemelham-se aos de ratos, cuja separação dos dígitos dos membros torácicos e pélvicos, hérnia umbilical, estágio de desenvolvimento dos olhos, lóbulo da orelha e rabo correspondem aos estágios Theiler 22 a 26 (DAVIDSON; BALDOCK, 1998).

Na placenta da paca em início de prenhez, averiguamos as mesmas regiões descritas para o *Guinea-pig* por Kaufmann e Davidoff (1977): decídua (capsular e basal), placenta vitelínica (visceral e parietal), placenta principal e subplacenta.

Roberts e Perry (1974) fizeram uma revisão comparando placentas entre os histicomorfos *Cavia porcellus*, *Galea musteloides* e *Erithizon dorsaium*, e relataram que a inversão completa do saco vitelínico ocorre após a implantação. Na paca, não foi possível provar em que período de prenhez realmente ocorre a inversão, visto que, neste estudo foram observadas as placentas já inseridas na face mesometrial da mucosa do corno uterino.

Sobre a morfologia placentária dos roedores sul-americanos, como é o caso da paca, cutia, da capivara e do mocó, dentre outros, alguns estudos foram realizados. Na cutia (*Dasyprocta aguti*), a placenta de terço médio e final de prenhez foi descrita como tendo implantação na região mesometrial, sendo conectada ao útero por uma mesoplacenta (RODRIGUES et al., 2003).

Em outros roedores como na paca (BONATELLI, 2005) e o mocó (OLIVEIRA et al., 2006) a placenta de meio e final de prenhez também apresenta inversão do saco vitelínico, com a placenta vitelínica visceral sendo a membrana mais externa recobrendo os fetos nesses períodos.

Os resultados obtidos sugerem que a paca, possui uma implantação semelhante ao da guinea-pig, ao qual descreve uma implantação anti-mesometrial com invasão na seqüência da face mesometrial da luz uterina (KAUFAMN; DAVIDOFF, 1977).

Butler e Juurlink (1987) ao descreverem embriões humanos, entre 44 a 53 dias de gestação, relatam que os estágios Carnegie 18 a 20, exprimem como características morfológicas externas à presença vesícula óptica com pigmentação da retina, presença dos membros em desenvolvimento com os sulcos dos dígitos evidentes, bem como a presença da vesícula ótica, fosseta nasal e de um plexo vascular evidente, corroborando assim, aos resultados descritos neste trabalho para embriões com 1,8 cm CR.

Theiler (1972) relata em estudo com embriões de rato, que os mesmos entre o estágio 20 e 21, estabelecem como características a presença da vesícula óptica com pigmentação da retina, os membros se apresentam bem característicos, com os sulcos digitais evidentes, presença da vesícula ótica e do cordão umbilical. Assim como nos resultados expostos, as características embriológicas assemelham-se ao embrião com 1,8cm CR, indo também de encontro aos resultados discutidos conforme Beaudoin et al. (2003) para coelhos entre 12 a 17 dias de gestação.

Evans e Sack (1973) para embriões de *Guinea pig*, entre 22 a 27 dias de gestação, relatam que os mesmos apresentam o neuróporo cranial fechado, os sulcos digitais estão evidentes e, os membros se encontram em formação, bem como a presença dos olhos pigmentados e a formação da vesícula ótica, fato este corroborado com os nossos resultados para o embrião de 1,8cm CR.

Theiler (1972) para embriões de ratos, entre os estágios 15 a 19, relata que os mesmos, esboçam como características embrionárias a presença do neuróporo cranial ainda aberto, os arcos brânquias são visíveis com os seus sulcos delimitando cada arco, a presença dos brotos dos membros em forma de “remo”. O autor relata o aparecimento das vesículas encefálicas, bem como a presença da vesícula óptica e da fosseta nasal e a evidência dos somitos individualizados. Essas representações podem ser vistas em nossos resultados para o embrião com 1,2 cm CR, como também eludidas em embriões de coelho conforme Beaudoin et al. (2003) entre 8 a 10 dias de gestação.

Evans e Sack (1973) ao estudarem embriões do *Guinea pig*, entre 16 a 22 dias de gestação relatam que as características embrionárias presentes, como, as 3

vesículas encefálicas, presença dos arcos branquiais, formação e individualização dos somitos, presença da vesícula óptica, saliência do coração e a formação dos brotos dos membros em formato de “remo”, corroboram com os resultados para o embrião com 1,2 cm CR.

Semelhante ao estágio Carnegie 16 e 17, para embriões humanos, as características presentes como, presença dos arcos branquiais, 4º ventrículo encefálico, proeminência do coração, broto dos membros em forma de “remo”, bem como a presença da proeminência do fígado e da vesícula ótica, assemelham-se ao embrião de paca com 1,2 cm CR, conforme relatado por Butler e Juurlink (1987).

A formação da medula e das vesículas encefálicas, a partir da porção do tubo neural ao quarto par de somitos, conforme citado por Moore e Persaud (2004) para humanos, e destas regiões, serem constituídas por um neuroepitélio composto por células que darão origem aos neurônios e células da macroglia segundo Junqueira e Carneiro (2004), estão de acordo com os resultados adquiridos para a paca.

O início do primórdio do aparelho respiratório inferior em humanos surge no 28º dia de gestação, com um sulco mediano na extremidade caudal da parede ventral da faringe primitiva, a fenda laringotraqueal. Ao final da 4ª semana do desenvolvimento humano, a fenda já se invaginou formando um divertículo respiratório saculiforme, o broto pulmonar, localizado na região ventral da porção caudal do intestino anterior, conforme averiguado na paca, o desenvolvimento do aparato respiratório vai de encontro com nossos resultados, como citado por Moore e Persaud (2004) e Sadler (2005).

Moore e Persaud (2004) relatam que em humanos o desenvolvimento dos brotos segmentares se inicia aos 41 dias de gestação, e os brotos subsegmentares aos 44 dias de gestação. Nos embriões de paca estudados, os lobos pulmonares já se encontram em processo de divisão, levando a acreditar que estes se encontram quando comparados às idades gestacionais em humanos, com 15 a 25 dias de gestação.

Durante o período embrionário humano, o pulmão encontra-se em fase pseudoglandular, quando se formam os brônquios e bronquíolos terminais, a próxima fase o período do desenvolvimento pulmonar é o canalicular, caracterizado pela sua alta vascularização (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Nossos achados estão de acordo com as descrições dos autores e acrescentamos que na paca, o pulmão ainda em fase pseudoglandular apresenta zonas de vasos

sangüíneos, iniciando seu processo de vascularização, antes mesmo de passar para o estágio canalicular.

O desenvolvimento do sistema digestório ocorre em consequência do dobramento cefalocaudal e lateral do embrião, onde parte da cavidade vitelina revestida de endoderma é incorporada ao embrião para formar o intestino primitivo (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Vindo de encontro com os autores, nossos achados estão de acordo com o citado, onde notamos a formação do esôfago, estômago, fígado e secções de intestino no embrião.

O esôfago em humanos é inicialmente curto, mas com a descida do coração ele se alonga rapidamente. A camada muscular, que é formada pelo mesênquima esplâncnico circundante, é estriada em seus dois terços superiores, e no terço inferior, a camada muscular é lisa (FITZGERALD; FITZGERALD, 1997; SADLER, 2005). Tal fato descrito pelos autores, corrobora com nossos achados para paca, o qual traz o esôfago alongado adentrando no estômago.

O estômago aparece como uma dilatação fusiforme do intestino anterior na quarta semana de desenvolvimento em humanos. Durante as semanas subseqüentes, sua aparência e posição se modificam, em consequência das diferentes razões do crescimento em diversas regiões de sua parede e das alterações na posição dos órgãos circundantes (MOORE; PERSAUD, 2004). Nossos achados vão de encontro com os achados do autor, uma vez que, o estômago apresenta-se em formato ovalado, devido ter sido feitos cortes latero-lateral no embrião, elucidando o formato fusiforme embriologicamente.

O fígado aparece em meados da terceira semana em humanos como uma evaginação do epitélio endodérmico, na extremidade distal do intestino anterior. Esta evaginação, o divertículo hepático, consiste de células de proliferação rápida que penetram no septo transversal, ou seja, na placa mesodérmica entre a cavidade pericárdica e o pedículo do saco vitelino. Durante o desenvolvimento subseqüente, os cordões epiteliais hepáticos se misturam às veias vitelina e umbilical, que formam os sinusóides hepáticos. Os cordões hepáticos começam a se diferenciar no parênquima e formam o revestimento dos ductos bilíferos (SANTOS; AZOUBEL, 1996; WOLPERT et al., 2000; SADLER, 2005). Desta forma como citado pelos autores, nossos achados corroboram com como os descritos na paca, onde, o fígado apresenta seu parênquima em diferenciação para formação dos cordões hepáticos, bem como para a formação dos sinusóides.

O intestino em embriões de cinco semanas pra humanos, encontra-se suspenso da parede abdominal dorsal por um mesentério curto e comunica-se com o saco vitelino por meio do ducto vitelino ou pedículo do saco vitelino (SADLER, 2005). O desenvolvimento intestinal caracteriza-se pelo alongamento rápido do intestino primitivo e seu mesentério, ocasionando a formação da alça intestinal primaria, o qual apresenta seu epitélio em desenvolvimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004;). Em seu ápice, a alça permanece em conexão aberta com o saco vitelino por meio do pedículo do saco vitelino (GARCIA; JECKEL NETO; FERNANDEZ, 1991). Nossos achados estão de acordo com os autores acima, uma que vez, o intestino nos embriões de paca, apresentava-se em comunicação com o pedículo do saco vitelino, além de apresentar-se com seu epitélio em desenvolvimento.

O sistema urinário em embriões humanos se desenvolve a partir do mesoderma intermediário, que se estende ao longo da parede dorsal do corpo do embrião. Durante o dobramento do embrião no plano horizontal, este mesoderma é deslocado ventralmente e perde sua conexão com os somitos. Uma elevação longitudinal, a crista urogenital, se forma em cada lado da aorta dorsal, dando origem a partes do sistema urinário e genital (MOORE; PERSAUD, 2004). A partir dessa formação surgem os rins que vão se desenvolver até o final da gestação. O primeiro conjunto de rins o pronefro, é rudimentar, sendo análogo aos rins dos peixes primitivos. O segundo conjunto, o mesonefro, é bem desenvolvido e funciona brevemente, sendo análogo aos rins dos anfíbios, e o terceiro conjunto o metanefro, torna-se o rim permanente (MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Indo de encontro com as descrições dos autores para humanos, o sistema urinário dos embriões de paca, apresentou-se com o desenvolvimento do mesonefro e do metanefro, além do aparecimento dos glomérulos e túbulos renais.

O coração e o sistema vascular aparecem em meados da terceira semana do desenvolvimento embrionário em humanos. O coração propriamente dito começa suas funções no início da quarta semana, esse desenvolvimento precoce, é necessário porque, o embrião crescendo rapidamente, sua oxigenação e necessidades nutricionais não serão satisfeitas somente através da difusão. Assim, um sistema cardiovascular é estabelecido, e este é derivado do mesoderma esplâncnico que forma o primórdio do coração, mesoderma para-axial e lateral

próximo ao placóide óptico e células da crista neural na região entre as vesículas óticas (MOORE; PERSAUD, 2004).

O indício do coração é o aparecimento de um par de cordões endoteliais, no mesoderma cardiogênico. Esses cordões se canalizam e formam os primórdios dos tubos cardíacos. Conseqüentemente com a fusão dos tubos cardíacos, uma camada externa do coração embrionário irá se originar, o miocárdio primitivo. Ainda em formato de tudo, o mesmo passa a ser revestido pelo endocárdio, revestimento interno, e o miocárdio primitivo tornam-se a parede muscular. O epicárdio é derivado de células endoteliais que se originam da superfície externa do seio venoso e se espalham sobre o miocárdio. Concomitantemente, o coração tubular se alonga e desenvolve dilatações e constrições alternadas, para formar o átrio e o ventrículo (GARCIA; JECKEL NETO; FERNANDEZ, 1991; MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Nossos achados corroboram com os autores acima citados, uma vez que, o coração da paca apresentava-se com a divisão em átrio e ventrículo, além de suas camadas constituintes e a aorta dorsal presente.

Conforme Vejsted, Offenberg e Maddox-Hyttel (2006) o Oct-4 está restrito as PGCs em camundongos e suínos. Nossos resultados expressam a marcação para o Oct-4, uma vez que, a paca encontra-se na família dos roedores. Podemos afirmar ainda que a marcação foi positiva para o fígado, rim e coração, elucidando que essas PGCs encontravam-se dispersas nos tecidos.

As PGCs assim como citadas por Yeom (1996) vão formar dois tipos de células especializadas, os oócitos e espermatozóides. Em nossos resultados pudemos encontrar outros sítios de PGCs nos embriões, não sendo visualizados nos embriões a formação das gônadas.

Na gastrulação as PGCs agrupam-se no mesoderma extra embrionário, migrando conseqüentemente para o saco vitelino (GINSBURG; SONW; MCLAREN, 1990). Indo de encontro com nossos resultados, podemos elucidar que o fato do intestino estar negativo para Oct-4, pode se relacionar ao fato dos embriões estarem em idades muito avançadas ou já ter migrado para outros lugares, uma vez que, o intestino e o saco vitelino estão em conexão no embrião.

Pesce e Schöler (2000) ressaltam que somente algumas células mantêm o Oct-4 positivo até a inativação dos gametas. Nossos achados estão de acordo com os autores, sendo que um pequeno número de células encontrava-se positiva nos embriões, apesar deste imunomarcador ser específico para ativação dos gametas.

Kurosaka, Eckardt e McLaughlin (2004) ressaltam que o Oct-4 encontra-se expresso nos blastômeros, na massa celular interna do blastocisto, no epiblasto e nas células tronco embrionárias em embriões bovinos. De acordo com nossos resultados para a paca, os órgãos derivados do mesoderma, como o rim e o coração, apresentaram imunomarcação positiva para o Oct-4, corroborando assim com os autores citados.

Beltrami et al. (2007) em estudos obtiveram linhagens de células em tecidos humanos adultos de fígado, coração e medula óssea, positivas a pluripotencialidade marcando-as com o Oct-4, NANOG e REX1. Nossos achados para paca, vão de encontro aos resultados referentes ao Oct-4 para o fígado e coração, pois pudemos visualizar uma marcação de pluripotencialidade em ambos os tecidos, fato este semelhante ao descrito pelos autores.

Segundo Sagrinati et al. (2006) experimentos de isolamento e caracterização de células progenitoras multipotentes, localizadas na cápsula de Bowman em rins adultos de humanos, foram realizados mediante marcação com Oct-4. Em nossos resultados expostos, pudemos analisar uma marcação positiva de oct-4 no mesênquima renal e nos túbulos renais, o qual pôde concluir ser um órgão de reserva de células progenitoras multipotentes, como sugerido pelos autores em experimentos.

Em estudos sobre a pré-implantação de embriões de camundongo, segundo Watson, Tam (2001) afirmam que a regulação do Oct-4 está fortemente associada às primeiras linhagens de células dos tecidos somáticos e extra-embrionário. Tal fato nos faz acreditar que essas células de linhagens germinativas, por não possuírem um gene pré-determinado para a formação de um órgão ou estrutura específica, nos fazem pensar serem células satélites que possuem a habilidade de migrar para todo o embrião.

A expressão de células progenitoras por CD34 e vimentina no fígado de humano está restrita ao endotélio da veia porta (TERRACE et al., 2007). Após análise imunohistoquímica no fígado para vimentina, pudemos averiguar, além dos resultados adquiridos pelos autores, uma positividade para o endotélio da veia centro lobular, bem como para os sinusóides hepáticos e o mesênquima constituinte.

Em estudos com a expressão dos filamentos intermediários, como vimentina e queratina, em embriões suínos, estes filamentos expressam positivamente em células do epiblasto e hipoblasto (PRELLE; HOLTZ; OSBORN, 2001). Células

derivadas do epiblastos formam o mesoderma, os quais derivam o sistema cardiovascular, excretor, reprodutor, além de células sangüíneas e vasos associados aos tecidos e órgãos. Em contrapartida, células do hipoblasto formam o endoderma, os quais derivam os revestimentos epiteliais das vias respiratórias e do trato gastrointestinal, além do fígado e pâncreas (MOORE; PERSAUD, 2004). Em nossos resultados com paca, pudemos observar que a vimentina foi imunopositiva para todos os sistemas acima citados, corroborando assim com nossos resultados.

Com a finalidade de caracterizar as células tronco embrionárias caninas, Aron (2006) afirma que a alfa-actina se expressa positivamente em corpos embrióides, como também marca células musculares lisas e esqueléticas na região de mesoderma. Nossos resultados vão ao encontro aqueles citados pela autora, uma vez que, os embriões de paca apresentaram imunopositividade para actina de músculo liso, explícitos no coração, rim e paredes de vasos constituintes dos órgãos analisados. Podemos ainda elucidar que a actina, mostra-se como um marcador abrangente, o qual varia de marcador específico para musculatura como também pra marcação de copos embrióides.

Junqueira e Carneiro (2004) ressaltam que a actina esta presente no músculo como filamentos finos compostos por subunidades globulares organizadas numa hélice de dois fios. Na maioria das células, a actina constitui uma rede no citoplasma e forma uma delgada camada. Nossos resultados somam-se aqueles do autor, pelo fato das marcações expressarem somente músculo constituinte de cada órgão, e estes estavam envolvidos quando marcados por essa camada de musculatura.

7 CONCLUSÕES

Do estudo realizado sobre o desenvolvimento embriológico e fetal em pacas (*Agouti paca* L. 1766) julgamos poder concluir que:

- Os períodos de desenvolvimento embrionário e fetal de pacas não podem ser comparados aos do modelo clássico para roedor, principalmente em se tratando da estimativa de idade gestacional (CR), devido ao período gestacional da paca ser mais longo que o dos roedores supracitados.
- A placenta da paca em início de prenhez é semelhante à placenta de *Guinea pig* e dos outros histricomorfos Sul-Americanos.
- A placenta vitelínica insere-se na superfície da placenta principal em suas margens projetando-se completamente sobre o embrião.
- A decídua capsular no início de prenhez é espessa e densa, e ao longo da prenhez se degenera.
- A embriogênese da paca, pode ser comparada ao desenvolvimento embriológico de ratos, *Guinea pig*, coelho e humanos nos diferentes estágios do desenvolvimento.
- A imunolocalização positiva de OCT-4 apresenta diferenças de acordo com a idade gestacional, devido às mudanças embriológicas dos tecidos.
- A vimentina como marcador de mesênquima se expressou positivamente em todos os órgãos do embrião de paca.
- A actina como imunomarcador de músculo liso foi expressiva nas áreas contendo musculatura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, C. J. R. Brazilian rodents: their habitats and habits. In: MARES, M.; GENOWAYS, H. **Mammalian biology in South America**. Pittsburg: Pymatuning Laboratory of Ecology, 1982. p. 143-166. (Special Publication Series).

ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. M. B.; MIGLINO, M. A.; MORAIS-PINTO, L. Morfologia do funículo umbilical em ovinos deslanados mestiços (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.37, n.3, p. 189-193, 2000.

ARON, A. **Characterization of canine embryonic stem cells by immunohistochemistry and Special Stains**. Tese. Research from Ballard High School, 2006, 25 p.

ARTHUR, G.H. **Reprodução e obstetrícia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 573 p. 1979.

BEAUDOIN, S.; BARBET, P.; BARGY, F. Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. **Fetal Diagnosis Therapy**, n. 18, p. 422-427, 2003.

BELTRAMI, A. P.; CESSSELLI, D.; BERGAMIN, N.; MARCON, P.; RIGO, S.; PUPPATO, E.; D'AURIZIO, F.; VERARDO, R.; PIAZZA, S.; PIGNATELLI, A.; POZ, A.; BACCARANI, U.; DAMIANI, D.; FANIN, R.; MARIUZZI, L.; FINATO, N.; MASOLINI, P.; BURELLI, S.; BELLUZZI, O.; SCHNEIDER, C.; BELTRAMI, C. A. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). **Journal of the American Society of Hematology**, v.110, n.9, p. 3438-3446, 2007.

BENTTI, S. B. Roedores da América Tropical. **Natura**, n.70-1, p.40-44, 1981.

BJÖRKMAN, N.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals-a review. **Scandinavian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 129-158, 1989.

BONATELLI, M. **A subplacenta da paca (*Agouti paca*, Linnaeus 1766)**. 2005. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BONATELLI, M. **Análise morfológica da placenta da paca (*Agouti paca*, L. 1766). Estudo microscópico de luz e microscopia eletrônica de transmissão**. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BOSCO, C. B.; DIAZ, S. V.; BOROX, J. P. Sinciotrofoblasto em placenta de termino de *Octodon degus*. Estudo ultramicroscópico de transmission y barrido. **Revista Chilena Obstetrícia e Ginecologia**. v. 62, n. 4, p. 149-256, 1997.

BUTLER, H.; JUURLINK, B. H. J. **An Atlas for Staging ammalian and Chick Embryos**. Boca Raton: C.R.C. Press Inc., 1987.

CADEMARTORI, C. V.; FABIÁN, M. E.; MENEGUETI, J. O. Biología Reprodutiva de *Delomys dorsalis* (Hensel, 1872) – Rodentia, Sigmodontinae – em área de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Journal of Neotropical Mammalogy**. v. 12, n. 2, p. 133-144, 2005.

CADEMARTORI, C. V.; FABIÁN, M. E.; MENEGUETI, J. O. Variações na abundância de roedores (Rodentia, Sigmodoninae) em duas áreas de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 6, n. 2, p. 147-167, 2004.

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

CARVALHO, M. A. M.; NEVES, W. C.; MIGLINO, M. A.; BEVILÁQUA, E. M. **As membranas fetais da cutia dourada (*Dasyporcta aguti*)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA, 17, 1996, Fortaleza. **Anais...Ceará: Sociedade Brasileira de Anatomia**, 1996. p. 89.

CLARK, J. D.; OLFERT, E. D. Rodents (Rodentia). In: FOWLER, M. E. **Zoo & Wild animal medicine**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 728-737.

COLLET, S. F. Population characteristics of *agouti paca* (rodentia) in colombia. **Biological Series**, Michigan, v.5, n.7, p.601, 1981.

COOKE, P. H. A filamentous cytoskeleton in vertebrate muscle fibers. **Journal Cell Biology**, v. 68, p. 539-556, 1976.

DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v. 3, p. 235-260, 1988.

DAVIDSON, D. R.; BALDOCK, R. A. **The Edinburgh mouse atlas**. University of Edinburgh: The Medical Research Council, 1998.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E.W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea pig: Na electron microscopic study. **Journal Anatomy**, v. 95, n. 3, p. 311-324, 1961.

DE FELICI, M. Regulation of primordial germ cell development i the mouse. **International Journal of Development Biology**, v. 44, p. 575-580, 2000.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. **Paca: os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p. 45-50.

DYBAN, A. P.; PUCHKOV, V. F.; BARANOV, V. S.; SAMOSHKINA, N. A. & CHEBOTAR, J. **Laboratory mammals**. In: _____. Objects of developmental biology. Nauka, Moscu, 1975. *Op. cit.* Sterba, 1975.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. 663 p.

EISENBERG, J. F. Order rodentia. In: _____. **Mammals of the neotropics – the northern neotropics**. Chigaco: University of Chicago, 1989. v. 1, p. 395-397.

EMMONS, L. H. Paca. In: _____. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: The University of Chicago, 1990. p. 204-205.

ENDERS, E. A. C.; WELSH, A. O. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **Journal Experimental Zoology**, v. 266, n. 6, p. 578-587, 1993.

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.

FELIPE, A. E.; MASSON, P. G.; RODRÍGUEZ, J. A.; ALZOLA, R. H. External morphological characterization of 60-days gestation *Myocastor coypus* (Coipu) fetuses. **International Journal of Morphology**, v. 1, n. 24, p. 71-76, 2006.

FERRAZ, R. H. S. **Estudo macro e microscópico da placenta de termo de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris* – CARLETON, M. D. 1984)**. 2001. 75 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

FERREIRA, G. J. B. C.; OLIVEIRA, M. F.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; MARTINS, J. F. P. Morfologia da placenta do rato do banhado (*Myocastor coypus* Molina, 1782). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 107-109, 2001.

FISCHER, T. V. Placentation in the American beaver (*Castor canadensis*). **American Journal Anatomy**, v. 131, n. 2, p. 159-184, 1971.

FITZGERALD, M. J. T.; FITZGERALD, M. **Embriologia Humana**. México: Editorial El manual Moderno, 1997.

FLETCHER T, F. E; WEBER A. F. **Veterinary developmental anatomy, veterinary embryology**. Minnesota: College of Veterinary Medicine University of Minnesota, 2004.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 75, p. 5034-5038, 1978.

FUKUDA, T.; HEDINGER, C.; GROSCURTH, P. Ultrastructure of developing germ cells in fetal human testis. **Cell Tissue Reserch**. v. 161, p. 55-70, 1975.

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Medicas Sul, 1991. 350p.

GASKELL, T. L.; ESNAL, A.; ROBINSON, L. L. L.; ANDERSON, R. A.; SAUNDERS, P. T. K. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: Identification of three subpopulation. **Biology of Reproduction**. v. 71, p. 2012-2021, 2004.

GINSBURG, M.; SONW, M. H. L.; MCLAREN, A. Primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521-528, 1990.

HAFEZ, E. S. E.; AFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4. Ed. São Paulo: Manole, 1982. 720 p.

HAMELETT, W.C.; RASWEILER IV, J.J. Comparative gestation and placentation in vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 343-346, 1993.

HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Editora Atheneu. 1995. 700 p.

HOLSTEIN, A.; SCHUTTE, B.; BECKER, H.; HARTMANN, M. morphology of normal and malignant germ cells. **International Journal of Andrology**. v. 10, p. 1-18, 1978.

HOSKEN, F. M. **Criação de pacas**. Cuiabá: Sebrae/MT, 1999. p. 25-26. (Série Natureza e Negócios, 2).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. Nomina Anatomica Veterinaria. 4. ed. Zurich: ICVAN, 1992. (together with Nomina Histologica, 2. ed. and Nomina Embryologica Veterinaria. 1994).

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestaço, fisiologia pr-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E. **Reproduo animal**. 6. ed. So Paulo: Manole. p. 217-240, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia bsica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAUFMANN, P.; DAVIDOFF, M. The guinea pig placenta. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**, v. 53, n. 2, p. 5-90, 1977.

KERTSCHANSKA, S.; SCHRDER, H.; KAUFMANN, P. The Ultrastructure of the trophoblastic layer of the degu (*Octodon degus*) Placenta: a re-evaluation of the "Channel Problem". **Placenta**, v. 18, n. 2/3, p. 219-225, 1997.

KLEIMAN, D. G.; EISENBERG, J. F.; MALINIAK, E. Reproductive parameters and productivity of caviomorph rodents. In: EISENBERG, J. F. **Vertebrate ecology in the northern neotropics**. Washington: Smithsonian Institution, 1979. p.173-183.

KNOSPE, C. Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat **Anatomy, Histology and Embryology**, n. 31, p. 37-51, 2002.

KUROSAKA, S.; ECKARDT, S.; MCLAUGHLIN, J.K. Pluripotent Lineage Definition in Bovine Embryos by Oct4 Transcript Localization. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1578-1582, 2004.

KURSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L.R. **Stem cells**: Scientific progress and future research directions. Bethesda: National Institute of health, Departamento de health and human services, Apendice B1-B11, 2001.

LATSHAW, W. K. Extraembryonic membranes and placentation. In: **Veterinary developmental anatomy – A clinical developmental**. Toronto: Becker, 1987. p. 49-74.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous developmentally regulated class of protein. **Annual Review Biochemistry**, v. 51, p. 219-250, 1982.

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

MACHADO, G. F.; FIGUEIREDO, F. **Reviso**: filamentos intermedirios. **Medicina**, v. 29, p. 104-113, 1996.

MACHADO, M. R. F.; MIGLINO, M. A.; NEVES, W. C.; BEVILAQUA, E. M. As membranas fetais da paca (*Cuniculus paca*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA, 17, 1996, Fortaleza. **Anais...** Ceará: Sociedade Brasileira de Anatomia, 1996. p. 89.

MATAMOROS, Y. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista de Biología Tropical**, v. 29, n. 1, p. 155-164, 1981.

MATAMOROS, Y. Notas sobre la biología del tepezcuinte, *Cuniculus paca*, brisson, (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio. **Brenesia**, n. 19/20, p. 71-82, 1982.

MATAMOROS, Y.; PASHOV, B. Ciclo estral del tepezcuinte (*Cuniculus paca*, Brisson) en cautiverio. **Brenesia**, n. 22, p. 249-260, 1984.

MIGLINO, M. A.; SOUZA, W. M.; NEVES, W. C.; BEVILAQUA, E. M. As membranas fetais da capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA, 17, 1996, Fortaleza. **Anais...** Ceará: Sociedade Brasileira de Anatomia, 1996. p. 124.

MITALPOV, S. M.; KUO, H. C.; HENNEBOLD, J. D.; WOLF, D. P. OCT-4 Expression in pluripotent cells of the Rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1785-1792, 2003.

MONDOLFI, E. La laca o paca. **Defensa de la naturaleza**, Caracas, v. 2, n. 5, p. 4-16, 1972.

MOOJEN, J. **Os roedores do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério de Educação e Saúde. Instituto Nacional do Livro, 1962. 214 p. (Biblioteca Científica Brasileira. Série A – II).

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**, 7. ed. Ed. Elsevier Ltda, 2004. 609 p.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NEVES, W. C. **Biologia da reprodução em cutias: morfologia placentária da cutia (*Dasyprocta aguti*)**. 2000. 94 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos**. 1. ed. [s.n.]: Acirbia, 1990, 399 p.

NOGUEIRA, T.M.R. **Alguns parâmetros fisiológicos e reprodutivos da paca (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766), em cativeiro**. 1997. 131 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) — Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M.; HAMADA, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**, v. 60, p. 461-472, 1990.

OLIVEIRA, F. S.; TONIOLLO, G. H.; MACHADO, M. R. F. Hemi-ovarioossalpingohisterectomia em pacas prenhes e posterior ocorrência de prenhez (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 547-551, 2003.

OLIVEIRA, F.S. **Diagnóstico e acompanhamento ultra-sonográfico da prenhez em pacas (Agouti paca, Linnaeus, 1766)**. 2002. 45 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) — Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

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

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

ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1986. 508p.

PÉREZ, H. C.; HERNANDES, F. Z. Comportamiento reproductivo y datos de la alimentación de *Agouti paca nelsoni*. **Acta Zoologica Lilloana**, v.35, p.283-285, 1979.

PERIS, S. C.; BARRIO, M. S.; ROEZNILLO, L. D.; LORDA, P. M.; VICENTE, J. T. **Manual de anatomia y embriologia de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos**. Zaragoza Espana: Ed Acribia, S.A., 1998.

PESCE, M.; GROSS, M. K.; SCHÖLER, H. R. In line with our ancestors : OCT-4 and the mammalian germ. **Bioessays**, v. 20, p. 722-732, 1998.

PESCE, M.; SCHÖLER, H.R. OCT-4: Control of totipotency and germ line determination. **Molecular Reproduction and Development**. v. 55, p. 452-457, 2000.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L. Mathias duval on placental development in mice and rats. **Placenta**, v. 27, p. 109-118, 2006.

PRELLE, K.; HOLTZ, W.; OSBORN, M. Immunocytochemical Analysis of Vimentin Expression Patterns in Porcine Embryos Suggests Mesodermal Differentiation from Day 9 after Conception. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 30, n. 6, p. 339-344, 2001.

RODRIGUES, R. F. **A estrutura e microvascularização da placenta de cutia (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, M. D. 1984)**. 2002. 62 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

SAGRINATI, C.; NETTI, G. S.; MAZZINGHI, B.; LSZZERI, E.; LIOTTA, F.; FROSALI, F.; RONCONI, E.; MEINI, C.; GACCI, M.; SQUECO, R.; CARINI, M.; GESUALDO, L.; FRANCINI, F.; MAGGI, E.; ANNUNZIATO, F.; LASAGNI, L.; SERIO, M.; ROMAGNANI, S.; ROMAGNANI, P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman`s capsule of adult human kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 9, p. 2443-2456, 2006.

SANTOS, H. S. L.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jaboticabal: Funep, 1996. 188 p.

SAUER, H.; RAHIMI, G.; HESCHELER, J.; WARTENBERG, M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol-3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 476, p. 218-223, 2000.

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

SILVA, F. Ordem Rodentia: mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1984. p.171-209.

SILVA, W. N. **Aspecto morfológico da placenta e anexos fetais da paca (*Agouti paca*, L. 1766)**. 2001. 61 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SMYTHE, N. Paca. In: ROBINSON, J. G.; REDFORD, K. H. **Microlivestock: little known small animals with promising economic future**. Washington: National Academy, 1991. p. 263-269.

TAM, W. H.; BURGESS, S. M. The developmental changes in the placenta of the guinea pig. **Journal Anatomy**, v. 123, n.3, p. 601-614, 1977.

TERRACE, J. D.; CURRIE, I. S.; HAY, D. C.; MASSON, N. M.; ANDERSON, R. A.; FORBES, S. J.; PARKS, R. W.; ROSS, J. A. Progenitor cell characterization and location in the developing human liver. **Stem Cell Development**, v. 16, n. 5, p. 771-778, 2007.

THEILER, K. **The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age**. New York: Springer Verlag, 1972.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

VEJSTED, M.; OFFENBERG, H.; MADDUX-HYTTEL, P. Identification of primordial germ cells in porcine embryos from the primitive streak stage. **Reproduction, Fertility and Development**, apresentado no Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orlando, FL, USA, v. 18, n. 1-2, 2006.

VIEIRA, C. Roedores e lagomorfos do estado de São Paulo. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 8, p.129-160, 1953.

WARTENBERG, H. Differentiation and development of testis. **The testis**, 2. ed. Nova York: Raven. 1981. p. 39-81.

WATSON, C. M.; TAM, P. P. Cell lineage determination in the mouse. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 3, p. 123-129, 2001.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammal species of the World**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. v. 2, 142 p.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSELL, P. L.; MEYEROWITZ, E. **Biologia do desenvolvimento**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 484 p.

YEOM, Y.I.; FUHRMANN, G.; OVITT, C. E.; BREHM, A.; OHBO, K.; GROSS, M.; HUBNER, K.; SCHOLER, H. R. Germline regulatory element of OCT-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. **Development**, v. 122, p. 881-894, 1996.

ANEXO A

Pacário mantido pelo Setor de Animais Silvestres do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

Legenda – Em A, B e C uma vista geral das baias e em D, E e F vista detalhada das baias com os filhotes e adultos.

ANEXO B

Pacário mantido pelo CECRIMPAS - Centro de Criação, Multiplicação e Pesquisa em Animais Silvestres do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos – UNIFEOB.