PHELIPE OLIVEIRA FAVARON

Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina

São Paulo

2012

PHELIPE OLIVEIRA FAVARON

Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
19/10/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2654
FMVZ

Favaron, Phelipe Oliveira

Placentação em *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina / Phelipe Oliveira Favaron. -- 2012.
182 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Saco vitelino. 2. Membranas fetais. 3. Roedores. 4. Células-tronco.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina", utilizando 10 (dez) ratos do capim, protocolado sob o nº1766/2009, 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 14/10/09.

We certify that the Research "Placentation in *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): characteristics of the placental eritrophagocytosis, transport and yolk sac inversion and versatility", utilizing 10 (ten) rats do capim, protocol number 1766/2009, 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 10/14/09.

São Paulo, 16 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FAVARON, PHELIPE OLIVEIRA

Título: Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae):
características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e
versatilidade vitelina

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Vilma de Oliveira** e
aos meus irmãos **Pedro Antônio** e **Leandro dos Santos**. Por
estarem sempre ao meu lado e por todo o carinho e cuidado.

OBRIGADO!

DEDICATÓRIA

À minha avó **Apparecida Marchezano** (*in memoriam*)
pela minha criação, por todo o carinho e bons exemplos do que ser,
e por estar sempre ao meu lado ...

AGRADECIMENTOS

Sábio é aquele que tem a humildade de pedir e aceitar ajuda, pois todo trabalho dividido se torna mais leve e prazeroso, e quando visto sob vários olhos, maiores são as chances de se obter êxito.

Difícil é encontrar palavras para agradecer a todos os tipos de ajuda recebida durante a execução deste trabalho de doutoramento. Uma simples palavra de conforto nos momentos de dificuldade, o aconselhamento técnico ou aquela mão-de-obra nos momentos mais corridos. Nenhuma destas formas de ajuda é mais ou menos importante, todas, ao seu tempo foram fundamentais.

Por isto serei sempre grato a cada um de vocês!

À **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino**, pela amizade, orientação segura deste trabalho e pelo exemplo de seriedade, dedicação e profissionalismo que nortearam grande parte da minha formação acadêmica. Fica aqui registrado meu sincero agradecimento e profundo respeito.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida de realizar o curso de Pós-graduação.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Profa. Dra. Andrea Mess**, pela amizade e disponibilidade em ajudar não apenas a mim, mas a todo o meu grupo. Tem sido um prazer e constante aprendizado trabalhar ao seu lado.

Ao **Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira**, por toda a ajuda despendida na obtenção das minhas amostras e constante disponibilidade em sanar minhas dúvidas. E a toda a equipe do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS-UFERSA).

À **Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho, Profa. Dra. Celina Almeida Mançanares e Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio** pelos ensinamentos desde a iniciação científica, mas principalmente pela amizade, disponibilidade e incentivo à carreira de pesquisador.

À **Dra. Daniele dos Santos Martins e Dra. Flávia Thomaz V. Pereira** pelas sugestões, amizade e acima de tudo pelo carinho.

À dois grandes nomes relacionados ao estudo da placenta e placentação, os quais tive a oportunidade de conhecer ao longo do curso de Pós-graduação: **Prof. Dr. Rudolf Leiser e Prof. Dr. Anthony Carter**, agradeço pelos ensinamentos e valiosos comentários que me ajudaram a conduzir esta pesquisa.

À **Dra. Pascale Chavatte-Palmer e Dra. Anne Tarrade** por terem tão bem me recebido durante meu estágio no INRA em Jouy-en-Josas, Paris-França, e por todos os ensinamentos durante o tempo dedicado às análises quantitativas da placenta, e por tornarem mais confortáveis os dias longe de casa.

À **Dra. Christiane Pfarrer** pelas valiosas considerações dadas ao meu trabalho durante as diversas vezes que nos encontramos.

À **Dra. Graciela Pignatari**, pela colaboração fundamental durante a execução desse trabalho, principalmente referente ao cultivo celular.

Ao amigo **Márcio Nogueira**, pelo convívio diário, paciência para comigo e cumplicidade. Que possamos sempre realizar nossos sonhos e alcançar nossos objetivos de vida!

À amiga **Sônia Will**, pela preocupação em ajudar-me a terminar minhas análises sem medir esforços.

Aos amigos **Luiz Fernando, Gislaine Coelho, Bruna Paiva, Mateus Miranda e Fernanda Missé**, por serem o escape aos problemas do dia-a-dia da pós-

graduação, pelos momentos especiais vividos ao longo desses anos de amizade. Pelo carinho e preocupação. Meu muito obrigado!

Aos amigos **Carlos Alberto Sarmiento** e **Rafael Cardoso Carvalho** pelo incentivo, pela amizade construída durante a pós-graduação e por serem companheiros com os quais posso contar a qualquer hora.

À **Dra. Rose Eli**, pelo constante apoio, troca de experiências e convívio durante a pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Paulo Maiorka**, pela ajuda nas análises histopatológicas dos camundongos nude e amizade.

Ao **Dr. Durvanei Maria** e **Profa. Dra. Cristina Massoco** pela disponibilidade em ajudar-me na leitura das análises de citometria de fluxo.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia** pelas dicas de como cultivar as células e considerações tão pertinentes durante o exame de qualificação.

À minha grande amiga **Dra. Adriana C. Morini**. Deixo aqui meu reconhecimento e profunda admiração por sua alegria, incentivo e dedicação ao trabalho.

Aos amigos **Bruno Vasconcelos**, **Érika Fonseca**, **Paula Fratini**, **Rosângela Rodrigues**, **Caio Biasi**, **Patrícia Braga**, **Marina Brollo**, **Valdir Pavanelo**, **Greyson Esper**, **Dilayla Abreu**, **Cristiane Wenceslau**, **Amanda Oliveira**, **Thais Lessa**, **Silvia Lima**, **João Leonardo**, **Juliana Passos**, **Caroline Winck**, **Fabiele Russo**, **Isabella Fernandes**, **Dayane Alcântara**, e **Fernanda Menezes** e a todos os outros colegas da pós-graduação pelo convívio diário durante essa jornada.

Aos funcionários e técnicos de laboratório: **Ronaldo Agostinho**, **Maicon Barbosa**, **Jaqueline Santana**, **Rose (secretária)**, **Ednaldo Farias**, **André Franciulli** e **Diogo Mader**, por facilitar o nosso dia-a-dia durante a pós-graduação.

Ao **Coseas-USP**, em especial as assistentes sociais **Fátima** e **Eliane** que souberam ser mais do que profissionais, souberam ser sensíveis aos meus problemas.

Aos professores do curso de Pós-graduação da FMVZ-USP: **Dr. José Roberto Kfoury Júnior**, **Dra. Paula de Carvalho Papa**, **Dr. Antônio Chaves de Assis Neto**, **Dr. Alan Ferraz de Melo** e **Dr. Pedro Primo Bombonato**, pelos ensinamentos e convivência.

"O excelente mestre não é o que mais sabe, mas o que mais tem consciência do quanto não sabe. Não é o que é viciado em ensinar, mas o mais ávido a aprender. Não é o que declara os seus acertos, mas o que reconhece suas limitações".

(A. Cury)

**"Enquanto caminho percebo a magia do tempo, que as vezes parece severo,
mas que sabiamente nos ensina a cada dia."**

Paula Fernandes

RESUMO

FAVARON, P. O. **Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)**: características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina. [Placentation in *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): characteristics of the placental erytrophagocytosis, transport and yolk sac inversion and versatility]. 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os roedores murídeos são melhor conhecidos em relação à placentação, porém descrições para outros grupos como os cricetídeos incluindo os “camundongos do Novo Mundo” ainda são escassos. Recentemente a placenta e as membranas fetais tem sido considerados fontes promissoras para a obtenção de células-tronco. Em particular, o saco vitelino é estruturalmente diverso e desempenha várias e importantes funções. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi descrever a placentação corioalantóidea e vitelina em *Necromys lasiurus*. Além de avaliar o potencial do saco vitelino como uma fonte de células-tronco mesenquimais. Para tanto, um total de 10 placentas variando de início ao final de gestação foram analisadas através de técnicas de histologia, imunohistoquímica e microscopia eletrônica, bem como através do cultivo e diferenciação celular, citometria de fluxo e imunocitoquímica. A placenta corioalantóidea discoidal era organizada em uma zona labiríntica, zona juncional e decidua. O labirinto era a região mais importante para as trocas materno-fetal. Próximo ao final da gestação ele apresentou uma barreira hemotricorial com espessura média de 2,41 μm . A zona juncional era composta por sincício e citotrofoblasto. Células trofoblásticas gigantes localizavam-se entre a zona juncional e a decidua, assim como nas margens laterais da placenta. A morfologia do saco vitelino visceral invertido variou de acordo com a sua localização e relação com a placenta e o útero. Quando cultivadas, as células aderentes do saco vitelino formaram colônias fibroblástico (92,13%) e expressaram marcadores de células-tronco mesenquimais e alguns para células precursoras de células-hematopoiéticas. As células apresentaram sucesso quanto às diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica e não desenvolveram formação tumoral quando injetadas em camundongo nude. Com isso, essas células-tronco despontam como uma fonte terapêutica promissora para a terapia celular.

Palavras-chave: Saco vitelino. Membranas fetais. Roedores. Células-tronco.

ABSTRACT

FAVARON, P. O. **Placentation in *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)**: characteristics of the placental erytrophagocytosis, transport and yolk sac inversion and versatility. [Placentação em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina.]. 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Murine rodents are well investigated in regard to placentation, but data for other groups such as cricetids including New World mice or Sigmodontinae are sparse. Recently the placenta and fetal membranes are regarded to be promising sources for obtaining stem cells. In particular, the yolk sac is structurally diverse and shows important functions throughout gestation. For this reason, this study aims to describe the chorioallantoic and yolk sac placentation in *Necromys lasiurus*. In addition, the potential of the yolk sac as a source for mesenchymal stem cells that are not well studied so far will be evaluated. In total, 10 individuals from early gestation to near term were investigated by means of histology, immunohistochemistry and electron microscopy as well as cell culture and differentiation, flow cytometry and immunocytochemistry. The discoidal chorioallantoic placenta was organized in a labyrinth zone, junctional zone, and decidua. The labyrinth was most important for maternal-fetal exchange processes. It possessed a hemotrichorial barrier of about 2.41 μm thickness near term. The junctional zone included syncytial areas and cytotrophoblasts. Trophoblast giant cells were located between the junctional zone and decidua as well as in the lateral margins of the placenta. The morphology of the inverted visceral yolk sac varies according to its location and relationship with the placenta and uterus. When cultured, the adherent cells of the yolk sac formed fibroblastoid colonies (92.13%) and expressed mesenchymal stem cells markers, and some hematopoietic precursor cells markers. They showed successful osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation and did not develop tumors when transferred to nude mice. Thus, these cells resulted as stem cells with promising therapeutic values for cell therapy.

Key-words: Yolk sac. Fetal membranes. Rodents. Stem cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 ASPECTOS GERAIS DA PLACENTAÇÃO.....	25
3.2 MORFOLOGIA DA PLACENTA, PLACENTA VITELINA E DECIDUA EM ROEDORES.....	26
3.3 SACO VITELINO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODO.....	34
4.1 DADOS BIOMÉTRICOS.....	34
4.1.1 Microscopia de luz.....	34
4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	35
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	36
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	37
4.5 EXTRAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS DO SACO VITELINO.....	37
4.6.1 Coleta das amostras.....	37
4.6.2 Cultivo celular – técnica de “explante”.....	38
4.6.3 Análise morfológica.....	38
4.6.4 Teste de viabilidade de criopreservação.....	39
4.6.5 Ensaio de unidade formadora de colônia.....	39
4.6.6 Ensaio calorimétrico de viabilidade celular.....	40
4.6.7 Caracterização celular por imunocitoquímica.....	40
4.6.8 Caracterização celular por citometria de fluxo.....	42
4.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	42
4.7.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica.....	42
4.7.2 Diferenciação condrogênica.....	43
4.7.3 Análise do potencial tumorigênico das células do saco vitelino em camundongos imunossuprimidos – nude.....	44
5 RESULTADOS.....	47

5.1	DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PLACENTA.....	47
5.2	DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PLACENTA.....	50
5.2.1	Região de implantação da placenta corioalantóidea.....	53
5.2.2	Região de labirinto e zona juncional.....	54
5.2.3	Decidua.....	64
5.2.4	Células trofoblásticas gigantes.....	66
5.2.5	Placenta vitelina visceral e parietal.....	68
5.2.5.1	Placenta vitelina visceral próxima ao útero.....	68
5.2.5.2	Placenta vitelina visceral próxima à placenta corioalantóidea.....	72
5.3	CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS DO SACO VITELINO.....	79
5.3.1	Estabelecimento da cultura celular.....	79
5.3.2	Análise morfológica das células do cultivo do saco vitelino.....	85
5.3.3	Teste de viabilidade de criopreservação.....	89
5.3.4	Ensaio de unidade formadora de colônia.....	91
5.3.5	Ensaio colorimétrico de viabilidade celular.....	92
5.4	CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	93
5.4.1	Imunocitoquímica.....	93
5.4.2	Citometria de fluxo.....	97
5.5	TESTE DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	103
5.6	ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO.....	106
6	DISCUSSÃO.....	109
6.2	PLACENTA E PLACENTAÇÃO.....	109
6.3	POTENCIAL DO SACO VITELINO COMO FONTE PARA A OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO.....	119
7	CONCLUSÕES.....	128
	REFERÊNCIAS.....	131
	APÊNDICES.....	146

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 40% das espécies de mamíferos (Classe Mammalia) correspondem a espécies pertencentes à Ordem Rodentia. A maioria das espécies de roedores é de pequenas proporções, fato que aliado ao aspecto geral da arquitetura corpórea, os tornam facilmente reconhecíveis, salvo algumas espécies como a capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*), o maior representante da Ordem (PEREIRA; ESTON, 2007), chegando a medir 1,30 m de comprimento e pesar até 100 Kg (MOREIRA et al., 2012).

A Família Cricetidae e Subfamília Sigmodontinae englobam os ratos e camundongos do Novo Mundo. Dentro da família Cricetidae encontram-se ainda os hamsters e os lemingues (MOSSMAN, 1987). A Subfamília Sigmodontinae é uma das mais diversificadas, sendo a segunda maior entre os roedores da Superfamília Muroidea. Possui cerca de 380 espécies, distribuídas em 74 Gêneros e 8 Tribos (REIG, 1984; NOWAK, 1999; MUSSER; CARLETON, 2005; POOR, 2005).

Necromys lasiurus é popularmente chamado de rato-do-capim, pixuna, coxexo ou calunga; é uma espécie de tamanho pequeno a médio, onde o comprimento da cabeça e corpo juntos varia de 86 a 124 mm. A cauda com 65 a 94 mm é mais escura na parte superior e moderadamente pilosa, mas com escamas aparentes, particularmente próximas à sua base. A pelagem do dorso varia de castanho-acinzentada a castanho-amarelada, com limite pouco definido com o ventre, que é branco ou amarelo-acinzentado. Um anel periocular mais claro, que pode ser muito tênue em alguns espécimes, está presente em volta de cada olho. Orelhas são pouco pilosas, exceto na sua base, com pêlos da mesma cor do dorso. O peso corporal dos adultos varia de 26 a 64 g. (BONVICINO et al., 2008). Habita formações abertas e florestais do Cerrado e ao longo do ecótono Mata Atlântica-Cerrado, além de áreas de vegetação aberta no estado do Pará (Figura 1). Esta espécie desempenha um importante papel no ciclo epidemiológico da peste bubônica, destacando-se na epizootização da peste no nordeste do Brasil. É um roedor silvestre muito prolífero e se desenvolve com relativa facilidade (BRASIL, 2002). A reprodução ocorre durante todo o ano, principalmente entre os meses de abril à junho. O período gestacional varia de 19 a 21 dias com média de 4 filhotes (FRANCISCO et al., 1995).

Figura 1- Em A, imagem evidenciando a espécie *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) e sua área de distribuição geográfica no Brasil (B)

Fonte - Adaptado de Bonvicino et al., 2008

Os trabalhos desenvolvidos com roedores na grande maioria das vezes estão associados a levantamentos sistemáticos, de ocorrência de espécies em uma determinada área, ou a problemas de saúde pública (CADEMARTORI et al., 2004) 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.

Björkman et al. (1989) relataram que os roedores por apresentarem aspectos característicos, tais como: tamanho adequado, baixo custo de manutenção e curto período de prenhes, podem ser excelentes modelos experimentais, embora faltem informações precisas sobre os aspectos reprodutivos de várias espécies, o que acaba por gerar, muitas vezes, interpretações errôneas de experimentos. Neste sentido, os roedores principalmente o camundongo, são considerados modelos animais adequados para se estudar a placentação, com resultados passíveis de comparação ao modelo humano (CROSS et al., 2003; MALASSINÉ et al., 2003; CARTER, 2007; SALBAUM et al., 2011). Ao contrário dos roedores murídeos (Família Muridae) onde encontram-se os hamsters, ratos e camundongos para os quais existem na literatura inúmeros trabalhos qualitativos e quantitativos a cerca de

diferentes aspectos relacionados à placenta e placentação (ADAMSON et al., 2002; COAN et al., 2006; VERCRUYSSSE et al., 2006; COAN et al., 2008; ZHANG et al., 2009; COAN et al., 2010; HU; CROSS, 2010; SENNER; HEMBERGER, 2010; TESSER et al., 2010; ZHANG et al., 2011, LI et al., 2012), pesquisas com cricetídeos (Família Cricetidae) ainda são bastante escassas (CARPENTER, 1972; PIJNENBORG et al., 1974; CARPENTER, 1975; KING e HASTINGS, 1977; FERRO; BEVILACQUA, 1994; FARIA; BEVILACQUA, 1995; FERRO et al., 1999; LIMONGI; FERRO, 2003, FAVARON et al., 2011).

Recentemente a placenta e seus anexos (cordão umbilical e membranas embrionárias e fetais) tem sido considerados fontes abundantes, eticamente aceitáveis e de fácil acesso de células-tronco mesenquimais (FERNANDES et al., 2012). Nos roedores, o saco vitelino é estruturalmente diverso e diferentemente das outras membranas que possuem principalmente a função de proteção física do embrião em desenvolvimento e retenção de líquidos, o saco vitelino desempenha várias e importantes funções ao longo da embriogênese (HYTTEL et al., 2010), como contribuição para o desenvolvimento do sistema vascular do embrião (AUERBACH et al., 1996; JAFREDO et al., 2005), é o local de migração das células germinativas primordiais para a gônada primitiva, contribui para a formação do intestino primitivo (HYTTEL et al., 2010), além de formar uma placenta vitelina funcional para as trocas materno-fetais nos roedores (MOSSMAN, 1987). Devido a essas características, o saco vitelino representa uma fonte promissora de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, embora para essas últimas a literatura hoje conhecida seja mais abrangente (GLOBERSON et al., 1987; LIU; AUERBACH, 1991; HUANG; AUERBACH, 1993; AUERBACH et al., 1996). No entanto, esses dados disponíveis para roedores são fruto de experimentos realizados com um número muito pequeno de espécies de murídeos, que na maioria das vezes, limitam-se aos ratos e camundongos não havendo literatura que contemple outros grupos de roedores.

1.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando a importância ecológica dos roedores da Família Cricetidae - Sigmodontinae, em especial da espécie *Necromys lasiurus*, bem como a escassez de literatura que aborde a biologia reprodutiva deste grupo, sobretudo no que diz respeito à placentação, desenvolvemos o presente trabalho como forma de caracterizar a morfologia placentária dessa espécie a fim de responder as seguintes perguntas: Seriam as características morfológicas da placenta comuns entre cricetídeos e murídeos, tendo sido as mesmas mantidas ao longo da evolução e especiação destes dois grupos? Se não, quais seriam as diferenças morfológicas existentes quanto à placenta e à placentação entre esses dois grupos? Além disso, devido à importância que o saco vitelino apresenta para os roedores verificamos qual o potencial dessa membrana como uma fonte alternativa para a obtenção de células progenitoras (células-tronco) mesenquimais e se as mesmas teriam a capacidade de diferenciação em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

As pouquíssimas informações existentes acerca da biologia reprodutiva dos roedores da Família Cricetidae, Sigmodontinae, em especial da espécie *Necomys lasiurus*, determina o objetivo deste trabalho, no sentido de buscar mais dados sobre a reprodução desta espécie inserida neste importante grupo da Ordem Rodentia, focando na descrição macroscópica e microscópica da placenta, e na elucidação do processo de placentação e transporte placentário, somado ao estabelecimento e caracterização de uma nova fonte de células-tronco mesenquimais oriundas do saco vitelino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Descrever macroscopicamente a placenta desta espécie, considerando seu formato e sua vascularização, bem como determinar seus valores de peso, volume e diâmetro;
- 2- Descrever a placenta através da microscopia de luz;
- 3- Caracterizar através da ultra-estrutura os diferentes tipos celulares na placenta e a placenta vitelina;
- 4- Descrever as relações materno-fetais que se processam na placenta, tomando como base o arranjo vascular e relação na interface materno-fetal na região do labirinto placentário, caracterizando sua barreira-placentária;
- 5- Caracterizar o processo de placentação e a relação do trofoblasto através da marcação com anticorpos específicos, para identificação da parede muscular dos vasos sanguíneos, identificação das células epiteliais e trofoblásticas, identificação do endotélio vascular, das células mesenquimais e do estroma da região da decídua;
- 6- Identificar e isolar as células-tronco mesenquimais do saco vitelino, e testar diferentes métodos de cultivo para as linhagens celulares e o congelamento e descongelamento das células obtidas no cultivo;
- 7- Caracterizar através da imunocitoquímica e citometria de fluxo as células oriundas do saco vitelino;

- 8- Testar a diferenciação celular das células do saco vitelino em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA PLACENTAÇÃO

Pouco tempo após a fertilização do óvulo inicia-se o processo de clivagem, a passagem desse óvulo já fecundado pela tuba uterina leva vários dias (DYCE et al., 1997). Durante a fase de blastocisto, este permanece de um a dois dias em contato com a superfície do endométrio e é envolvido pela secreção das glândulas endometriais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Para sobreviver, o embrião precisa estabelecer logo uma relação fixa com o endométrio uterino, enquanto isso não ocorre, o mesmo fica livre dentro do lúmen, nutrindo-se do leite uterino (DYCE et al., 1997). Esta demora antes da ligação denominada de implantação ou nidação confere aos embriões a oportunidade de encontrar um local favorável para seu estabelecimento, dando continuidade ao seu desenvolvimento. Porém, para que a implantação ocorra em mamíferos euterianos, torna-se necessário que o trofoblasto chegue a um estado invasivo e que o endométrio uterino tenha chegado a um estado de receptividade (DYCE et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2006).

Todavia, independentemente do grau de intimidade que possa vir a existir entre os tecidos maternos com os embrionários, estes processos sempre envolvem duas fases iniciais, comuns a todas as espécies, que correspondem às fases de *aposição* e *adesão*, o que vai resultar na interação entre o trofoblasto e o endométrio de forma direta, promovendo finalmente a fixação do embrião (OLIVEIRA, 2004).

Após a implantação do embrião, as células do estroma do endométrio tornam-se alongadas e poligonais, tomando em conjunto um aspecto epitelióide, e o endométrio passa a ser chamado de decídua (KIM et al., 1999; FONSECA et al., 2012).

A placenta se forma em função do sucesso da implantação do blastocisto no útero, representando o órgão funcional da unidade biológica materno-fetal. 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).

Dyce et al. (1997) mencionam que a placenta pode ser definida como a *aposição* ou *fusão* de tecido fetal e materno com objetivos de trocas fisiológicas e

produção hormonal. Apesar de uma placenta provisória poder ser estabelecida pelo saco vitelino e fornecer um órgão útil para trocas metabólicas no início da gestação, a estrutura definitiva nos mamíferos eutérios é a placenta corioalantóidea (para a maioria das espécies domésticas), sendo que, para os marsupiais e roedores, o saco vitelino consiste na principal contribuição do feto para a placentação (HILDEBRAND, 1995).

A placenta apresenta morfologia bastante diversificada, apresentando 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, de nutrientes e também de metabólicos (LEISER; KAUFMANN, 1994; FITZGERALD; FITZGERALD, 1997; OLIVEIRA, 2004).

3.2 MORFOLOGIA DA PLACENTA, PLACENTA VITELINA E DECIDUA EM ROEDORES

O modo de evitar um contato prolongado do trofoblasto com o tecido conjuntivo materno é a migração rápida do trofoblasto ao endométrio e invasão de vasos maternos para que se estabeleça uma condição hemocorial entre os sistemas sanguíneos materno e fetal (ENDERS; WELSH, 1993).

Normalmente as espécies da Ordem Rodentia possuem uma placenta principal zonária discoidal, corioalantóidea e estruturalmente organizada em três regiões distintas: labirinto, zona juncional ou espongiotrofoblasto e decidua (COAN et al., 2004). Essas camadas de tecido são responsáveis por promover os meios necessários para regular a comunicação e transferência de nutrientes, hormônios, íons, gases, excretas e água entre a mãe e o embrião/feto em desenvolvimento. Ultraestruturalmente a placenta corioalantóidea é classificada como hemocorial, pois a interação materno-fetal resulta da invasão do leito vascular uterino pelo trofoblasto, que passa a ser banhado pelo sangue materno extravasado, assim como ocorre em outros animais como chiropteros (LUCKETT, 1993; ENDERS et al., 1998; BADWAIK; RASWEILER, 2000), xenartras (ENDERS, 1960; ADAMOLI et al., 2001; REZENDE et al., 2012), lagomorfos (LEISER; KAUFMANN, 1994; CARTER; ENDERS, 2004) e na própria placenta humana (MAYHEM; BURTON, 1997; MALASSINÉ et al., 2003).

No entanto, filogeneticamente o número de camadas de tecido trofoblástico na região da interface materno-fetal varia dentre as diferentes espécies. Dentre os roedores e lagomorfos (Clado Gliriformes) são observados os três modelos existentes: hemomonocorial (MESS, 2003; KAUFMANN, 2004; BONATELLI et al., 2005; MESS, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; KANASHIRO et al., 2009; FLAMINI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), hemodicorial (LEISER; KAUFMANN, 1994; CARTER; ENDERS, 2004) e hemotricorial (KING; HASTINGS, 1977; LIMONGI; FERRO, 2003; COAN et al., 2004; FAVARON et al., 2011).

King e Hastings (1977) compararam através da microscopia eletrônica de transmissão a barreira-placentária de seis gêneros de roedores da Subordem Miomorfa e Família Cricetidae (*Lemmus*, *Dicrostonyx*, *Clethrionomys*, *Microtus* e *Peromyscus*). Foi observado pelos autores que a barreira-placentária dessas espécies examinadas era do tipo hemotricorial. As células endoteliais nesse grupo continham regiões fenestradas.

Outra espécie da Família Cricetidae (*Calomys callosus*) foi estudada por Limongi e Ferro (2003). Nesse trabalho, a placenta foi descrita como sendo composta pelas regiões de espongiotrofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto. A barreira-placentária era constituída por três camadas de células trofoblásticas (camadas I, II e III), sendo classificada como hemotricorial. A espécie tem sido estudada ainda quanto aos aspectos relacionados às células trofoblásticas, principalmente relacionados à sua capacidade de invasiva (FERRO; BEVILACQUA, 1994; FARIA; BEVILACQUA, 1995; FERRO et al., 1999).

Recentemente realizamos uma análise comparativa da placenta e da placentação de 5 espécies de cricetídeos (*Necomys lasiurus*, *Oryzomys subflavus*, *Oryzomys* sp., *Oligoryzomys megacephalus* e *Oligoryzomys* sp.). No entanto, como a maior parte das amostras era proveniente de uma coleção do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e as mesmas estavam fixadas há muito tempo em formoldeído 10%, não foi possível aprofundar os estudos pelas técnicas de imunohistoquímica. A placenta corioalantóidea apresentou como principais regiões o labirinto, espongiotrofoblasto e regiões de células trofoblásticas gigantes. Uma placenta vitelina invertida também foi evidenciada, a qual persiste até o final da gestação. Nessas espécies a barreira-placentária era do tipo hemotricorial, com camadas de citotrofoblasto e espongiotrofoblasto (FAVARON et al., 2011).

Outra característica marcante da placenta dos roedores é quanto à presença de diferentes tipos de células trofoblásticas. Ansell et al. (1974) dizem que o desenvolvimento da decídua em roedores está associado com a produção de células multinucleadas e gigantes. Em ratos, são identificadas células binucleadas, que aparecem ao longo da zona secundária ou antimesometrial da decídua pelo oitavo dia de gestação (KREHBIEL, 1937). Em camundongos, esta região caracteriza-se por apresentar células bi, tri ou tetranucleadas (SNELL; STEVENS, 1966).

Deane et al. (1962) investigaram as prováveis funções das células binucleadas em placentas de ratos e camundongos na produção de hormônios esteróides, capacidade invasiva e fagocítica, visto que essas células são vistas na periferia da placenta fetal, em associação íntima com a decídua e com seios de sangue materno.

Segundo Hemberger (2007), morfologicamente as células trofoblásticas gigantes exibem características extraordinárias adaptadas para o sucesso da prenhez. Esse é o primeiro tipo celular definitivo a se diferenciar após a fertilização (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1988), originando-se da camada mais externa do trofoectoderma do blastocisto durante o período de peri-implantação. Após a implantação, as células gigantes derivadas da parte mural do trofoectoderma colaboram para formar a placenta vitelina parietal.

Dos dois compartimentos fetais (labirinto e zona juncional), essa última é a menos conhecida até o momento. Sabe-se que é um compartimento celular formado por dois subtipos de trofoblasto: o espongiotrofoblasto e as células de deposição de glicogênio, sendo que ambos os tipos celulares, são criticamente importantes para a sobrevivência do feto (COAN et al., 2006).

No tocante a placentação em roedores é caracterizada pela formação de duas membranas placentárias diferentes. Além da placenta corioalantóidea que promove a relação hemocorial entre o sangue materno e o fetal, existe ainda a placenta vitelina (LEISER; KAUFMANN, 1994; TAKATA et al., 1997; OLIVEIRA, 2004).

A placenta vitelina é tida como uma placenta funcional em roedores, sendo de grande importância antes da formação da placenta corioalantóidea, pois é a única estrutura presente no feto com responsabilidade nos processos de trocas entre mãe e feto (OLIVEIRA, 2004). Além disso, está associada à transferência de imunidade

passiva da mãe para o feto (BRAMBELL, 1958; LALIBERTÉ et al., 1984), nutrição histiotrófica (CHAN; WONG, 1978; ENDERS; CARTER, 2006; AMBROSO; HARRIS, 2012), síntese de hormônios (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2008) e hematopoiese (YODER; PALIS, 2001; LUX; YODER, 2010).

3.3 SACO VITELINO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco podem ser classificadas em três categorias distintas de acordo com a literatura segundo o período de isolamento durante a ontogênese, sendo elas: embrionárias, fetais e adultas. O termo células-tronco refere-se a células que possuem a habilidade de gerar células-filhas com características similares às suas próprias, ou seja, similares as da célula-mãe, além disso, possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas. Nesse contexto, podemos citar como exemplos as células-tronco hematopoiéticas que originam todas as células da linhagem hematopoiética, as células-tronco neurais que originam neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (GAGE, 2000) e as células-tronco mesenquimais que se diferenciam em fibroblastos, osteoblastos e adipócitos (HAYNESWORTH et al., 1992). Além desses grupos, tem-se ainda as células progenitoras, as quais compõe um grupo que esta comprometido com uma determinada linhagem celular com capacidade de auto-renovação limitada ou ausente, tendo sido identificadas na medula óssea (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005).

Podemos dizer que as células-tronco fetais constituem uma fonte alternativa de células-tronco. Essa fonte de células, recentemente descoberta, pode ser isolada a partir do próprio feto e de estruturas anexas e que conferem suporte ao feto. Com isso, o cordão umbilical, o sangue do cordão umbilical, o âmnio, o líquido amniótico e a placenta são fontes de células-tronco fetais que se destacam nesse campo. As células-tronco de sangue de cordão umbilical foram primeiramente utilizadas no transplante medular em 1988 (BROXMEYER et al., 1989), existindo em muitos países bancos de células-tronco provenientes do cordão umbilical, as quais são utilizadas para o tratamento de doenças hematológicas. O principal tipo de célula-tronco isolada dos tecidos fetais são as células-tronco mesenquimais, que possuem um potencial de expansão superior as células-tronco derivadas de tecidos adultos e

são menos imunogênicas, pois não expressam antígeno tipo II de superfície leucocitário humano - HLA (MIAO et al., 2006).

Devido às dificuldades que envolvem a utilização de células-tronco embrionárias, relacionadas a questões éticas e a baixa plasticidade das células-tronco adultas, recentemente, as membranas fetais (âmnio, alantóide, saco vitelino e córion) tem sido consideradas fontes abundantes, eticamente aceitáveis e de fácil acessibilidade para a obtenção de células-tronco mesenquimais, além de causarem menos problemas imunogênicos (FERNANDES et al., 2012).

Diferentemente das outras membranas que possuem principalmente funções de proteção mecânica contra atritos, ou retenção de líquidos, e nesse sentido quase nada contribuem para a formação do embrião, o saco vitelino é estruturalmente mais complexo e funcionalmente mais ativo, desempenhando diferentes funções ao longo da gestação.

Em roedores, devido à sua importância o saco vitelino desenvolve-se e forma uma membrana ativa para as trocas materno-fetais, a placenta vitelina. Nesses animais, o saco vitelino é estruturalmente diversificado e como mencionado anteriormente, o mesmo, desempenha várias e importantes funções durante o desenvolvimento embrionário. Somado a essas funções, deve-se ressaltar o importante papel que o saco vitelino exerce para o desenvolvimento do sistema vascular do embrião (AUERBACH et al., 1996; JAFREDO et al., 2005), sua contribuição para a formação do intestino médio e migração das células germinativas primordiais para a gônada em desenvolvimento (HYTTEL et al., 2010).

Grupos de células esféricas que expressam diversos marcadores de células-tronco hematopoiéticas foram observados no interior das principais artérias intra-corpóreas e extra-embrionárias (vitelínica e umbilical) em embriões de camundongos (GARCIA-PORRERO et al., 1995; NORTH; STACY, 1999; BRUIJN et al., 2000) e humano (TAVIAN et al., 1996; LABASTIE et al., 1998; TAVIAN et al., 1999), e acredita-se que representem células-tronco de linhagens hematopoiéticas definitivas. Estudos mostraram que as células-tronco hematopoiéticas definitivas formadas no saco vitelino contribuem somente para a hematopoiese primitiva (MULLER et al., 1994), e estas células apresentam definitivamente um potencial hematopoiético.

Uma correlação morfológica da síntese, absorção, transporte e eritropoiese são encontrados no saco vitelino, por exemplo, do cão no final da gestação e diminui

bem próximo ao parto. No embrião em desenvolvimento, a hematopoiese inicial ocorre nas ilhotas vasculares do saco vitelino. Estas são formadas por agregados de mesoderma que migraram no início da formação. As células externas, segundo Choi (2002), são diferenciadas em células endoteliais, enquanto que as internas em sangue primitivo. O término da associação do desenvolvimento entre hematopoiese e células endoteliais sugere que elas partam de um progenitor comum, o hemangioblasto.

As primeiras células sanguíneas se desenvolvem dentro de ilhotas vasculares na camada de mesoderma do saco vitelino (JOLLIE, 1990; FERNANDES et al., 2012) as quais são originadas a partir de hemangioblastos primitivos que dão origem a células endoteliais e sangue primitivo (AUERBACH et al., 1996). Diante disso, todos os diferentes tipos de células sanguíneas se desenvolvem a partir de células-tronco hematopoiéticas, as quais representam uma população quiescente de renovação própria (JOLLIE 1990). Mesmo com inúmeros trabalhos que buscam caracterizar a origem da eritropoiese embrionária, é notável que a ontogenia e maturação das linhagens celulares que levam à sua formação, são mais complexas do que previamente demonstrado (BARON et al., 2012).

Apesar das diferenças existentes entre espécies, o modelo da formação da célula progenitora hematopoiética no saco vitelino é similar no camundongo e no homem (PALIS; YODER, 2001). Sendo estes precursores hematopoiéticos derivados do saco vitelino, responsáveis por colonizar diferentes tecidos fetais (fígado, timo, baço e medula óssea) (MOORE; METCALF, 1970). Por essa razão, vários trabalhos tem buscado averiguar o potencial do saco vitelino para a obtenção de células-tronco hematopoiéticas (GLOBERSON et al., 1987; HUANG; AUERBACH, 1993; AUERBACH et al., 1998; JAFREDO et al., 2005).

Além disso, pesquisas desenvolvidas por Globerson et al. (1987), Liu e Auerbach (1991) e Godin et al. (1995) identificaram no saco vitelino uma população de células pluripotentes capazes de diferenciar em células hematopoiéticas.

O uso das linhagens de células-tronco hematopoiéticas obtidas do saco vitelino tem mostrado resultados significativos e promissores para a terapia celular, embora que ainda utilizando modelos experimentais. Corn et al. (1991) realizaram a injeção de células-tronco isoladas do saco vitelino em camundongos halogênicos e os resultados confirmaram a capacidade das células do saco vitelino em originar células T, B e macrófagos/monócitos maduros. Ao testar a funcionalidade das

células injetadas, sob forma de produção de anticorpos específicos notou-se a presença de células competentes na produção de anticorpos funcionais, como os linfócitos B. Yoder et al. (1997) relatam que as células do saco vitelino isoladas por volta do nono dia em camundongos, quando enxertadas, foram capazes de repovoar o fígado e a medula óssea de camundongos recém-nascidos. Além disso, os mesmos mencionam que células com alto potencial de proliferação estão presentes no saco vitelino em número significativamente maior e por um período de tempo mais longo do que em outros tecidos. A transferência *in vivo* das células-tronco do saco vitelino também foi capaz de repovoar o baço de camundongos que tiveram seu sistema hematopoiético previamente destruído por doses letais de radiação (CORN et al., 1991; AUERBACH et al., 1996).

Afora esses resultados obtidos com as células-tronco hematopoiéticas, outro tipo celular que pode ser isolada *in vitro* a partir do saco vitelino é a célula-tronco mesenquimal. No entanto, existem poucas referências acerca da obtenção de linhagens de células-tronco mesenquimais a partir do saco vitelino.

Wang et al. (2008) ao estudarem as células-tronco mesenquimais isoladas do saco vitelino de humanos notaram que as mesmas possuíam morfologia fibroblastóide e eram hábeis em formar colônias. As mesmas foram imunopositivas para marcadores de pluripotência (OCT-4 e Nanog) e para marcadores mesenquimais (CD105, CD73, CD29, CD44, CD166, e HLA-ABC) e eram negativas para marcadores hematopoiéticos e endoteliais (CD45, CD14, CD19, CD34 e CD31). Ao testarem o potencial de diferenciação em tecidos mesodermiais, as mesmas se diferenciaram somente para osteoblastos e adipócitos.

Recentemente, Wenceslau et al. (2011) estudaram em fetos de cães algumas órgãos como fontes de células mesenquimais progenitoras, as quais são encontradas co-localizadas em territórios hematopoiéticos específicos. Entre eles, o saco vitelino, mostrou-se uma fonte promissora de células-tronco mesenquimais. As células oriundas dessas culturas se diferenciaram em tecido ósseo e cartilaginoso, além de expressarem a proteína Oct 3/4 (em pequeno número) e caderina para endotélio vascular (VE-caderina). Quando injetadas em camundongos imunossuprimidos não desenvolveram teratomas.

Neste contexto, o saco vitelino torna-se uma fonte promissora de células-tronco pelo fato de possuir nichos de células hematopoiéticas e estromais durante o desenvolvimento embrionário e fetal, embora seja ainda uma fonte pouco explorada.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Para esta pesquisa foram utilizadas 10 placentas de *Necomys lasiurus* em diferentes fases do período gestacional, a fim de se observar o máximo de modificações morfológicas que ocorrem na placenta durante o processo de placentação. Por outro lado, amostras do saco vitelino foram coletadas e colocadas em cultivo a fim de verificar o potencial dessa membrana para obtenção de células progenitoras. As amostras foram coletadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte.

4.1 DADOS BIOMÉTRICOS

As placentas foram mensuradas com um paquímetro de aço inoxidável, a fim de determinar o diâmetro, e com o uso de uma balança digital (0,001 gramas – modelo MARTE) foi determinado o peso. Também foi calculado o volume orgânico da placenta segundo “Princípio de Arquimedes” (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994). Em seguida foi analisada a forma e as características externas da placenta e a presença de outros anexos embrionários. Dados relacionados ao tamanho “Crown-rump” baseando-se na metodologia estabelecida por Evans e Sack (1973) e peso dos embriões e fetos também foram coletados.

A nomenclatura utilizada foi referida conforme estabelecido pelo International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature e International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 1994.

4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Fragmentos das placentas foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e ou metacarm. Após a fixação o material foi lavado em tampão fosfato, seguido de desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), seguido de diafanização em xilol, para então serem embebidos em similar de parafina (Histosec®)¹ (TOLOSA et al., 2003).

¹ HISTOSEC-MERCK, lote K91225309

Os blocos foram cortados em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) obtendo-se cortes de 5 μm , os quais foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60° C.

Após serem desparafinizados os cortes, foram corados seguindo-se técnicas rotineiras de coloração de tecido, usando a coloração de Hematoxilina e Eosina e reação histoquímica de P.A.S. (ácido periódico de Schiff), com fundo de hematoxilina.

Em seguida as lâminas foram analisadas e as características morfológicas encontradas fotodocumentadas.

4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram realizadas reações de imunohistoquímica em cortes de placenta para citoqueratina (1:300, PU071-UP, Biogenex, San Ramon, California, U.S.A.) para identificação das células epiteliais e trofoblásticas, alfa-actina de músculo liso (1:300, Clone 1A4, Dako, Cytomation, Carpinteria, California, USA) com a finalidade de identificar a parede muscular dos vasos sanguíneos, a vimentina (1:300, mouse monoclonal anti-human antibody: RTU-VimV9; Novacastra, Wetzlar, Germany) para identificação do endotélio vascular fetal, das células mesenquimais e do estroma da região da decídua. Além disso, utilizamos também a marcação com DBA- lectina (1 mg/ml) para identificar as células “natural killer” uterinas e o PCNA-3 - proliferating cell nuclear antigen (1:300, clone PC10; Sigma, St. Louis, USA) para verificar as regiões da placenta que apresentavam proliferação celular. É importante ressaltar que o controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (Goat anti-Mouse IgG – AP 308F, Chemical International, Temecula, California, USA).

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, e na segunda passagem de etanol 100% os cortes tiveram a peroxidase endógena bloqueada em 3% H_2O_2 em etanol 100%, por 20 minutos. Estes cortes foram então hidratados em concentrações decrescentes de etanol, e em seguida foram tratados com tampão citrato 0,1M pH 6,0 e irradiados em microondas de uso caseiro, na potência máxima (700MHz), três vezes durante cinco minutos. Depois os cortes foram equilibrados em

tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M pH 7,4 onde o bloqueio de proteínas foi realizado com o kit Dako Protein Block (X 0909, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos. As inclusões com anticorpos primários foram realizados em câmara úmida overnight à 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Kit Dako LSAB (K 0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 45 minutos, seguido de streptoavidina do mesmo Kit também por 45 minutos. A reação foi visualizada pela adição do revelador DAB (Revelador Líquido DAB + Substrate Chromogen System, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 5-7 minutos, seguido de contra-coloração com hematoxilina e montagem em Permount (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos com cerca de 0,5 cm² forma obtidos de diferentes regiões da placenta em amostras de início, meio e final de gestação. Os mesmos foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4. Após completar a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4. Logo após, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% por duas horas. Concluída a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em solução tampão por três vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, foram imersos em acetato de uranila aquosa saturada por 1 hora, lavados em tampão e submetidos à desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes.

Os fragmentos foram lavados em óxido de propileno, durante 10 minutos, após isso iniciou-se a infiltração em araldite SO₂ - Polysciences. Os fragmentos foram imersos em uma mistura de óxido de propileno e araldite na proporção de 1:2 durante uma hora, 1:1 durante 12 horas, araldite pura durante 4 horas e finalmente em araldite pura mais ativador, para assim então, confeccionar os blocos, sendo levados à estufa a 60 °C por três dias.

Obtidos os blocos, foram confeccionados cortes semifinos com 0,4 µm de espessura em ultramicrótomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems - Germany), corando-se a quente em solução aquosa de azul de Toluidina a 1% e analisando-os em microscópio de luz, para então obtenção dos cortes ultrafinos.

Para isto, foram feitos cortes com 0,07 μm de espessura que foram coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2%, durante 7 a 10 minutos, e logo após em citrato de chumbo a 0,5%, durante o mesmo período utilizado para o acetato de uranila. O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft Imaging, Germany) e diferentes regiões da placenta corioalantóidea e da placenta vitelina foram caracterizadas e eletromicrografadas.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para esta técnica, amostras das placentas foram fixadas em glutaraldeído 2,5%. Em seguida foram lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim as mesmas foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

4.6 EXTRAÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS DO SACO VITELINO

4.6.1 Coleta das amostras

Foram realizadas 2 coletas de amostras do saco vitelino na Universidade Federal Rural do Semi-Árido Nordestino – UFERSA, em Mossoró, Rio Grande do Norte, durante os períodos de 07 à 13 de abril de 2010 e 27 de abril à 01 de maio de 2011. Após serem coletadas as amostras, estas foram transportadas para o laboratório de Células-Tronco da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Para a obtenção das amostras, foi realizada uma incisão cirúrgica no saco gestacional, a fim de promover a exposição dos embriões, bem como dos anexos fetais. Inicialmente separamos as membranas fetais, com o objetivo de isolar o saco vitelino, o qual foi coletado e acondicionado separadamente em placas de petri com

solução de PBS-L (Phosphatase Buffer Solution Livre de Cálcio e Magnésio). Seguido este procedimento, as amostras acondicionadas foram levadas para o fluxo laminar, de forma que os materiais utilizados, a superfície de contato e o ambiente estavam esterilizados, reduzindo assim as chances de qualquer tipo de contaminação das amostras no meio de cultura.

Por fim os fragmentos de saco vitelino foram mantidos em um meio para transporte até chegar a Universidade de São Paulo, São Paulo, contendo 10 ml de soro fetal bovino (10%), 5 ml de antibiótico estreptomicina/penicilina (5%) e 85 ml de meio DMEM-F12 ou DMEM - High Glicose.

4.6.2 Cultivo celular – técnica “explante”

As amostras inicialmente foram lavadas em solução de PBS-L para então, serem maceradas manualmente (fragmentação mecânica), com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos de tecido provenientes do saco vitelino, em torno de 3 mm de diâmetro.

Os explantes de saco vitelino foram implantados em placas de cultivo de 30x15mm de diâmetro (corning) preenchidas com 5 ml de meio de cultivo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glicose, suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) caracterizado ou definido da marca HyClone e 1% de estreptomicina/penicilina. As placas foram mantidas em estufa a uma temperatura de 37,0° C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.6.3 Análise Morfológica

Para descrição da morfologia microscópica das células derivadas do cultivo do saco vitelino, as amostras foram avaliadas periodicamente e fotografadas em média a cada 3 dias através de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). Desta forma acompanhou-se a evolução da cultura das células progenitoras derivadas do saco bem como a variação morfológica das células durante seu crescimento.

4.6.4 Teste de Viabilidade de Criopreservação

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas do saco vitelino de *Necromys lasiurus* foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células derivadas do cultivo do saco vitelino derivadas da digestão através da enzima trypse a 0,25%, foram ressuspensas em 1,5 ml de meio de congelamento e igualmente distribuídos em criotubos (corning). Os criotubos foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados. O meio de congelamento utilizado era composto por 45% de DMEM-High Glicose, suplementado com 45% de SFB (GIBCO), 10% de DMSO (LGC-Bio)

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C . Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos (corning) foi transferida para tubos de polipropileno de 15ml com meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino definido. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo para expansão das células.

4.6.5 Ensaio de Unidade Formadora de Colônia

Para avaliar a capacidade de formar colônias das células progenitoras do saco vitelino, foi realizado o ensaio de CFU-f. Para tanto, 10^3 células ainda na primeira passagem (P1) foram plaqueadas em placas de cultivo com área de 90 mm de diâmetro. As células foram mantidas por 16 dias em cultivo, sendo que o meio foi trocado a cada 3 dias. Decorrido esse período, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta. O valor considerado para o cálculo da quantificação das CFU-f foi o número de colônias com mais de 50 células no 16º dia de cultivo, dividindo pelo número total de células progenitoras plaqueadas. Essa metodologia foi baseada no trabalho de Tondreau et al. (2004).

4.6.6 Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT)

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmichael et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta, que uma vez precipitado a 1.000 rpm por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofotometria a 550 nm.

A análise foi realizada a cada 48 horas durante 12 dias, para verificação da proliferação celular das células do saco vitelino. Para tanto, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 wells em um volume de 100 μ L/poço para cada dia de experimento. Em cada um dos dias de análise, o meio de cultura foi removido, e as células lavadas com 100 μ L de PBS/poço, seguido da adição de 100 μ L de solução de MTT (1 mL de MTT - 5mg/mL em 10 mL meio de cultivo contendo 1% de SFB). Essa solução foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o formazan foi precipitado a 1000 rpm durante 10 min e posteriormente solubilizado em 50 μ L de DMSO. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (M-Quant – Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.6.7 Caracterização celular por imunocitoquímica

Foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de cultivo com 24 poços de 3mm de diâmetro cada, os quais possuíam uma lamínula de vidro. Após 48 horas, quando as células atingiram a confluência de 70-80%, todo o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas com PBS por 2 vezes de 5 minutos. Posteriormente, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em solução de TBS (Tampão Salino de Tris) por 2 vezes de 5 minutos para retirar o fixador.

Para as amostras nas quais seria adicionado anticorpo com marcação nuclear conhecida, foi realizada a permeabilização da membrana celular através da adição de Triton a 0,1% em TBS até cobrir toda a superfície da lamínula por 10 minutos em

temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram novamente lavadas 2 vezes com solução de TBS por 5 minutos.

Em seguida, para evitar reações inespecíficas, foi utilizado solução de 5% de soro fetal bovino (SFB) em TBS por 1 hora em temperatura ambiente (500 µL/poço) em todas as amostras.

Após este período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com os anticorpos primários: Oct-4 (C-10, sc5279, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Nanog (n-17, sc30331, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Citoqueratina 18 (RGE53, sc-32329, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Vimentina (O.N.602, sc-73259, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), VEGF (Clone VG1, M7273, DakoCytomation, CA, USA), Stro-1 (sc-47733, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), β -tubulina (2146, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), PCNA-3 (clone PC10; sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD-73 (C-20, sc-14684, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD-117 (c-Kit, SCF-Receptor Ab-6, RB-1518-R7, Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA), CD-105 (2Q1707, sc-71042, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD34 (BI-3C5, sc:19621, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD-90 (Thy-1, aTHy-1A1, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e CD48 (4H9, sc-8397, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) diluídos em PBS na concentração de 1: 50.

Passado este período, as células foram lavadas com TBS por 3 vezes por um período de 5 minutos cada. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Texas-Red, anti-goat conjugado com FITC (F0479, DakoCytomation, CA, USA) ou anti-mouse IgG conjugado com FITC (AP308F, Chemicon International, Temecula, CA, USA) na diluição de 1:100 por uma hora em câmara escura. Em seguida, as células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes de 5 minutos, seguida por uma lavagem em água destilada, sendo as lâminas posteriormente montadas com o kit de montagem para fluorescência Vectashield com DAPI (H-1200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA). Para visualizar as reações foi utilizado o microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) nas objetivas de 20x e 40x.

4.6.8 Caracterização celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada para verificar a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais, hematopoiéticas e de pluripotência celular. Para tanto, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 400G por 5 minutos e ressuspensas em PBS na concentração de 1×10^5 células/mL, para finalmente serem incubadas com 1ml dos anticorpos: Oct $3/4$, Nanog, Vimentina, β -tubulina, Citoqueratina 18, CD45, CD48, CD105, CD34, CD90, CD73, CD117, CD48, Stro-1, PCNA-3 e VEGF, na diluição de 1:100 por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as células foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse FITC (DAKOCytomation, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europe) na diluição de 1:100 por 2 horas ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo as células foram lavadas e analisadas através do citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD) com um laser azul (488 nm).

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. Para eliminar uma possível autofluorescência, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. Para cada amostra, foram contados no mínimo 10000 eventos.

4.6 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

4.7.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica

Aproximadamente 40.000 células/mL (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5.000 células/mL (controle) foram cultivadas em placas de 24 poços. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo ou quando as células haviam atingido uma confluência em torno de 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e 1 mL de meio de indução para adipócitos ou osteócitos foi adicionado ou somente o meio DMEM-High acrescido de 7,5% SFB (Invitrogen) para o controle. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ sendo que metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, até a diferenciação celular ocorrer. As células foram monitoradas por microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100).

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o DMEM-High acrescido de 15% SBF, suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich) e para os osteócitos o DMEM-High com 7,5% SBF suplementado com 0,1 μ M de dexametasona (Decadron injetável), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

Além da microscopia de contraste de fase ao final, as células (controle e teste) foram submetidas a diferentes colorações de acordo com o tecido padrão esperado.

As células diferenciadas em adipócitos, osteócitos e seus controles após aproximadamente 21 dias tiveram seu meio removido e foram lavadas com PBS. Após lavagens consecutivas, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas com PBS 3 x e seguiram para o protocolo de coloração.

As células submetidas a diferenciação adipogênica foram coradas com a solução de sudan II-escarlata (TOLOSA et al., 2003) por 2 a 5 minutos, lavadas em álcool 70% e em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos. As lâminas foram montadas em glicerina.

As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente, e após, lavadas em água destilada e coradas com solução de nitrato de prata a 5% ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada, expostas a lâmpada de 100W por 60 minutos para coloração por Von Kossa (TOLOSA et al., 2003) e então, lavadas rapidamente com tiosulfato de sódio a 5% para então serem contra-coradas com hematoxilina de Harris. Por fim, as lâminas foram montadas em permout.

4.7.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada utilizando o kit *STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen).

Primeiramente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente um milhão de células ressuspendidas em 2 mL de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas à 1200 rpm durante 10 minutos e

ressuspendidas em 2 mL do meio de diferenciação do kit *STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit* preparado seguindo as instruções do fabricante.

As células foram novamente centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos e o botão celular foi colocado cuidadosamente com tampa semi-aberta na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de 21 dias.

Passado o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas em formol tamponado a 10% durante 2h. Em seguida, elas foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool etílico em concentrações crescentes (50, 70 e 90%), seguidos de 3 banhos em álcool 100% com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol com duração de 5 a 10 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast.

Após inclusão, cortes de 3-4 µm foram realizados em micrótomo automático e colocados sobre lâminas silanizadas durante aproximadamente 12 h. Ao final, as amostras foram coradas com Picrosírius e Tricrômio de Masson (JUNQUEIRA et al., 1979; TOLOSA et al., 2003).

4.7.3 Análise do potencial tumorigênico das células de saco vitelino em camundongos imunossuprimidos – nude

Para observar a formação de tumores, aproximadamente um milhão células foram inoculadas via intramuscular no membro pélvico esquerdo de 2 camundongos imunossuprimidos (nude). Os camundongos inoculados com as células foram mantidos no Biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo) por um período de 8 semanas. Semanalmente os animais foram avaliados para observar a possível formação tumoral.

Passado o período de 8 semanas, os animais foram eutanasiados e amostras do músculo bíceps femural, fígado, rim, pulmão e gordura (tecido adiposo) foram coletadas seguindo as recomendações e o protocolo aprovado pelo comitê de ética da FMVZ-USP.

As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e após 48 horas, os tecidos foram processados e incluídos em parafina. Cortes de 5 mm foram aderidos a lâminas histológicas e corados com Hematoxilina de Harris, por 3 minutos e Eosina por 15

segundos. Por fim, as lâminas foram montadas com permount e posteriormente analisadas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados a seguir estão organizados segundo os objetivos previamente definidos para um melhor entendimento e compreensão da morfologia da placenta e do processo de placentação propriamente dito, no roedor *Necomys lasiurus*. Somado a isso, a descrição morfológica parte dos dados macroscópicos, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Na microscopia de luz e transmissão, os resultados estão organizados seguindo-se a ordem em que as diferentes regiões e estruturas da placenta aparecem.

Após a descrição da placenta e placentação seguem-se os resultados relacionados ao cultivo das células progenitoras provenientes do saco vitelino.

5.1 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PLACENTA

Foram analisadas macroscopicamente 10 placentas de *Necomys lasiurus* nos estágios de início (n=3, 10-13 dias de gestação), meio (n=3, 15-16 dias de gestação) e final de gestação (n=4, 19-21 dias de gestação). Todas as amostras foram coletadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido em Mossoró, Rio Grande do Norte.

Durante a coleta das amostras pode-se verificar que o útero dessa espécie era do tipo bicórneo, com gestações ocorrendo nos dois cornos uterinos (Figura 2A). Após a abertura dos mesmos, os fetos e as placentas foram expostos para análise macroscópica.

A placenta do *Necomys lasiurus* apresentou-se durante todos os períodos gestacionais (início, meio e final) com formato discóide, onde a união da membrana coriônica (cório frondoso) com o epitélio uterino apresentava-se restrita a uma região específica em formato de disco, sendo, portanto essa placenta classificada como zonária discoidal (Figura 2B).

Na sua face fetal a placenta conectava-se com o embrião ou feto através do cordão umbilical. Puderam ser observadas duas regiões distintas no disco placentário dessa espécie, uma periférica e outra central, distinguindo-se uma da outra através de sua coloração “*in situ*” ou até mesmo após a fixação em

formoldeído. A região central com coloração mais escura era a que mantinha-se conectada com o cordão umbilical (Figura 2B).

Os dados biométricos de peso (g), diâmetro (cm) e volume das placentas e peso (g) e comprimento (cm) dos fetos foram determinados como forma de avaliar as condições e fases de seu respectivo desenvolvimento e podem ser observados em detalhe na tabela 1.

Figura 2- Em A: Características macroscópicas do corno uterino gestante (CUT) de *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Notar a impressão do disco placentário (P) ainda revestido pela parede uterina e membranas fetais. Em B: Características macroscópicas da placenta principal (corioalantóidea). Observar o formato discoidal e a intensa vascularização periférica. Notar a conexão do cordão umbilical, na região central da face fetal do disco placentário e o saco vitelino visceral revestindo a mesma região

Tabela 1- Relação de dados colhidos e valores absolutos do comprimento (Crown-rump – CR, cm) e peso dos fetos (g), diâmetro (cm), peso (g) e volume (ml) das placentas e o fixador utilizado para cada amostra, referentes aos espécimes de *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) coletados no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS, Mossoró, Rio Grande do Norte

	Número de Filhotes	Embriões/Fetos		Diâmetro	Placenta	Volume	Período gestacional	Fixador
		CR	Peso					
Fêmea 1	Embrião 1			Implantação			Início	Paraformoldeído 4%
Fêmea 2	Embrião 1	0.5	0.067	0,3	0,065	0,3	Início	Paraformoldeído 4% e
	Embrião 2	0.5	0.072	0,4	0,074	0,3	Início	Glutaraldeído 2,5%
Fêmea 3	Embrião 1	0,6	0,488	0,7	0,181	0,7	Meio	Paraformoldeído 4%
	Embrião 2	0,7	0,598	0,8	0,184	0,8	Meio	Paraformoldeído 4% e Cultivo Celular
	Embrião 3	0,7	0,595	0,8	0,180	0,7	Meio	Paraformoldeído 4% e Cultivo Celular
Fêmea 4	Feto 1	1,3	0,854	0,6	0,281	1,0	Final	Metacarn e Cultivo Celular
	Feto 2	1,1	0,744	0,7	0,365	0,9	Final	Glutaraldeído 2,5% e Cultivo Celular
Fêmea 4	Feto 1	1.5	0,984	0,9	0,371	1,0	Final	Paraformoldeído 4% e Cultivo Celular
	Feto 2	1.6	0,987	0,8	0,335	1,0	Final	Glutaraldeído 2,5%

5.2 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PLACENTA

Na microscopia verificou-se que a placenta de *Necromys lasiurus* apresentou tanto componentes maternos quanto componentes de origem fetal, os quais se associavam entre si possibilitando a realização das trocas metabólicas entre a mãe e o feto garantindo assim o desenvolvimento do embrião e feto até o seu nascimento.

Na microscopia de luz e eletrônica de transmissão a placenta dessa espécie foi classificada como pertencente ao tipo corioalantóidea, labiríntica, hemocorial do subtipo hemotricorial e com zonas de espongiotrofoblasto (zona juncional) e células trofoblásticas gigantes. Além disso, uma região de decídua materna foi identificada como resultado de modificações da parede uterina através de um processo de decidualização. Na face fetal da placenta observamos a placenta vitelina parietal e visceral recobrando o disco placentário.

As principais regiões placentárias podem ser observadas a seguir, em um corte de microscopia de luz e em um esquema da mesma região (Figura 3) e também em um corte observado sob o microscópio eletrônico de varredura (Figura 4). Além disso, através da técnica de microscopia eletrônica de varredura pode-se observar em maior detalhe a relação existente entre o disco placentário e a região de implantação da placenta na parede uterina e também a ramificação dos vasos oriundos do cordão umbilical para o interior da placenta corioalantóidea (Figura 4). Nas amostras avaliadas sob a técnica de microscopia eletrônica de varredura, o saco vitelino parietal também foi evidenciado, mostrando-se constituído por células de formato cúbico que revestiam a face fetal do disco placentário (Figuras 4C-F). As células vitelínicas parietais estavam sustentadas por uma fina membrana de natureza acelular, denominada de membrana de Reichert (Figura 4F).

Figura 3- Vista panorâmica da placenta corioalantóidea de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: Histologia evidenciando as características da placenta. Coloração: hematoxilina e eosina. Em B: Esquema ilustrando as diferentes regiões da placenta e alguns anexos. SVV: saco vitelino visceral, SVP: saco vitelino parietal, C: cordão umbilical, Lab: labirinto, CTG: células trofoblásticas gigantes (localizadas em duas regiões distintas), ET: espongiotrofoblasto, Dec: decídua e contendo AM: artérias maternas

Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura da placenta corioalantóidea (Plac corioal) de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: visão panorâmica da placenta mostrando seu formato discoidal. Observar a conexão do cordão umbilical centralmente ao disco e as ramificações dos vasos sanguíneos fetais (VSF) que partem deste para o interior do tecido placentário (B, C e D). Em D: notam-se ainda as células que compõe o saco vitelino parietal (SVP) revestindo a face fetal da placenta. Em E e F: Observar o saco vitelino parietal (SVP) cujas células são suportadas pela membrana de Reichert (MR) revestindo a superfície do disco placentário. Notar ainda a relação entre o labirinto (LAB), espongiotrofoblasto (ESP), decídua (DEC) e parede uterina (UT)

A seguir são apresentadas de forma detalhada as características de cada uma das regiões placentárias observadas.

5.2.1 Região de implantação da placenta corioalantóidea

Durante a coleta das amostras obtemos uma fêmea em estágio bem inicial de gestação. De modo que processamos para a microscopia de luz o fragmento uterino inteiro onde estava ocorrendo à implantação. Dessa forma pudemos avaliar a relação entre o endométrio uterino e a placenta corioalantóidea, bem como a relação existente entre o saco vitelino visceral e o endométrio uterino (dados estes descritos mais adiante no item “*Placenta vitelina visceral próxima a parede uterina*”).

Durante o período de início de gestação, a placenta corioalantóidea implanta-se no útero gradualmente. De modo que a mesma pode apresentar-se em algumas regiões já em intimo contato com o endométrio uterino e em outras regiões ainda aproximando-se do mesmo (Figura 5).

Nos locais onde a placenta corioalantóidea não se implantou ainda, o útero mostra-se histologicamente intacto, com epitélio simples cúbico ou prismático seguido de uma camada de tecido conjuntivo. Conforme ocorre o contato com as células trofoblásticas da placenta corioalantóidea esse mesmo epitélio se modifica tornando as células mais globosas e desorganizadas. Nesse momento o epitélio uterino e o tecido conjuntivo subjacente passam por um processo de decidualização, modificando-se para receber a aposição dos tecidos fetais e com isso se estabelece a placenta definitiva (Figuras 5B e C).

Como resultado desse processo há a formação da decídua. Embora essa não faça parte da placenta propriamente dita, ela está em intimo contato com as células fetais da zona juncional. Inúmeras células trofoblásticas gigantes foram observadas nessa região (Figura 5E).

Tardiamente, nas placentas de meio e final de gestação essas células trofoblásticas formarão uma faixa contínua entre o espongiotrofoblasto e a decídua (dados mostrados mais adiante).

Figura 5- Microscopia de luz da placenta corioalantóidea de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) em início de gestação. Em A: visão panorâmica de um corte longitudinal da placenta corioalantóidea (PLC) apresentando diferentes relações com a parede uterina (UT) durante o processo de implantação. Três regiões diferentes são apresentadas em detalhe: região 1 (Figuras B e C) correspondem a placenta e a parede uterina, a qual ainda apresenta seu epitélio intacto; região 2 (Figura D) local de início do contato entre a placenta e o útero e região 3 (Figura E), região onde a placenta já está implantada no endométrio uterino podendo ser visualizadas células trofoblásticas gigantes (seta). Coloração hematoxilina e eosina

5.2.2 Região de Labirinto e Zona Juncional (Espongiotrofoblasto)

Em uma visão panorâmica da placenta corioalantóidea em estágios de meio e final de gestação (Figura 3) a região de labirinto corresponde à maior porção do disco placentário como um todo.

O labirinto é constituído por colunas de células trofoblásticas, que delimitam lacunas tubulares ou espaços preenchidos de sangue materno extravasado sem

revestimento endotelial, denominados de lacunas maternas, os quais são percorridos por capilares fetais (Figuras 6 e 7).

Ao contrário das lacunas maternas que não apresentam revestimento endotelial devido à ação das células trofoblásticas que agem nessa região degradando e rompendo os vasos sanguíneos e liberando seu conteúdo, os capilares fetais ali mergulhados no sangue materno apresentam a parede endotelial intacta. O revestimento endotelial dos capilares fetais ficou evidente sob a técnica de imunohistoquímica com marcação com o anticorpo DBA-lectina (Figura 6).

Ainda a fim de avaliar os componentes da região do labirinto, sua estrutura e relação foram realizadas as marcações imunohistoquímicas com os anticorpos alfa-actina e vimentina.

Os capilares fetais foram positivos para os anticorpos alfa-actina e vimentina revelando uma parede endotelial íntegra e contínua (Figura 7). Enquanto que os vasos maternos quando presentes apresentaram a parede endotelial rompida e descontínua.

A marcação por imunohistoquímica para vimentina evidenciou também que a região de espongiotrofoblasto não apresenta vasos sanguíneos de origem fetal, apenas estão presentes na região lacunas de sangue materno extravasado, uma vez que o espongiotrofoblasto não apresentou positividade para o anticorpo vimentina (Figura 7).

Figura 6- Detalhe da região de labirinto na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: Notar os canais de sangue materno extravasado, também denominados de lacunas maternas (LM) rodeados pelos capilares fetais (CF); os quais apresentam sua parede endotelial intacta (seta). Coloração hematoxilina e eosina. Em B e C: A imunomarcacão para DBA-lectina apresentou afinidade pelos capilares fetais (setas) reagindo positivamente nas células endoteliais. Notar os espaços sanguíneos maternos (LM). Fundo de hematoxilina

Figura 7- Imunolocalização para vimentina na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontine). Em A e B: notar a reação positiva no endotélio dos capilares fetais (setas) presentes na região de labirinto (LAB) e também nos vasos sanguíneos da placenta vitelina visceral (SVV). Observa-se ainda a ausência de vasos sanguíneos fetais no espongiotrofoblasto (ESP). O controle negativo foi realizado utilizando IgG como anticorpo primário (Figura B). Fundo de hematoxilina

Tentando entender a relação materno-fetal na região do labirinto placentário e descrever e caracterizar os elementos que compõe a barreira-placentária, foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão e com isso elucidou-se as camadas de tecido que separam a circulação materna da circulação fetal, impedindo assim um contato direto entre os dois sistemas sanguíneos na placenta de *Necromys lasiurus*.

Os espaços sanguíneos maternos predominam na região do labirinto sob à análise por microscopia eletrônica de transmissão. Esses espaços são preenchidos por sangue materno que corre livremente devido à ausência de uma parede endotelial (Figura 8).

Em contato direto com os elementos sanguíneos maternos presentes nas lacunas maternas estava uma primeira camada de células trofoblásticas de três que foram identificadas. Essas três camadas se interpõem entre os dois sistemas sanguíneos (materno e fetal) impedindo assim um contato direto entre eles. Por conta disso, junções intercelulares são evidentes entre essas três camadas (Figura 8C). Além das três camadas trofoblásticas denominadas de TI, TII e TIII, também estava presente o endotélio do capilar fetal (Figura 8).

Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão da placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) evidenciando a barreira-placentária na região de labirinto. Notar que interpondo-se entre os sistemas sanguíneos materno (SM) e o fetal (SF) existem três camadas trofoblásticas (TI, TII e TIII) mais o endotélio do capilar fetal (CF e seta em A) que separam os dois sistemas sanguíneos. Em C e D: detalhe das junções intercelulares na camada trofoblástica I e a relação existente entre as camadas TI e TII. Barras: 2 μ m

Após descrever as características da barreira-placentária, mensuramos a distância existente a partir do endotélio do capilar fetal até a membrana da primeira camada trofoblástica – TI (em contato com os elementos sanguíneos maternos), ultrapassando assim as outras duas camadas intermediárias (TII e TIII), a fim de se estimar a espessura da barreira-placentária nessa espécie. Os dados foram coletados em 10 regiões distintas das amostras processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Com isso, obtivemos 2,41 μm como valor médio da espessura da barreira-placentária (Tabela 2).

Tabela 2- Valores referentes à espessura (μm) da barreira-placentária de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)

Espessura (μm)
1,92
2,44
2,26
2,76
2,03
2,26
3,03
2,80
1,20
3,29
Total: 24,07
Média: 2,41 μm

A zona juncional é formada principalmente pelo espongiotrofoblasto. Comparando as amostras de início de gestação com as de meio e final pudemos elucidar o desenvolvimento e as transformações sofridas por essa região ao longo da placentação.

Nas fases iniciais do desenvolvimento o espongiotrofoblasto apresenta-se localizado na parte mais interna do disco placentário delimitado por grandes espaços sanguíneos e pela região da decídua (Figura 9A), na forma de aglomerados de células trofoblásticas, confirmado pela marcação para citoqueratina (Figura 13B). Essas células principalmente no início da gestação são bastante proliferativas conforme mostra a imunomarcação para PCNA-3 (Figura 9C e D).

Com o progresso da gestação a zona de espongiotrofoblasto apresentou uma característica lobulada (Figura 7) entremeada por grandes espaços sanguíneos maternos. O espongiotrofoblasto era formado por células trofoblásticas com diferentes características. Tanto regiões de citotrofoblasto quanto regiões de sinciotrofoblasto foram identificadas (Figura 10). O sinciotrofoblasto foi caracterizado por apresentar várias células dividindo um mesmo citoplasma de maneira a formar um sincício. O citotrofoblasto por sua vez, apresentou células grandes, com citoplasma abundante contendo núcleo desenvolvido, cromatina evidente, porém dispersa (Figura 10).

Figura 9- Microscopia de luz da placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) em início de gestação evidenciando o desenvolvimento da região de espongiotrofoblasto (ESP) ou zona juncional o qual é constituído por células trofoblásticas como evidenciado pela imunomarcação para citoqueratina (Figura B). Em A: coloração hematoxilina e eosina. Uma alta proliferação celular é notada nessa região em início de gestação conforme observa-se nas imagens de imunohistoquímica para PCNA-3 (Figuras C e D). D = decídua

Figura 10- Microscopia eletrônica de transmissão da placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Notar as diferenças na morfologia entre as regiões de sinciotrofoblasto (Sin TB) e citotrofoblasto (Cit TB). Observar que as células que compõe o citotrofoblasto apresentam citoplasma distinto para cada uma, enquanto que o sinciotrofoblasto caracteriza-se por não apresentar limites citoplasmáticos, várias células compartilham do mesmo citoplasma (seta em B). MS: sistema sanguíneo materno e LM: lacuna materna. Barras: 5 μ m

5.2.3 Decídua

A decídua propriamente dita não faz parte da placenta, no entanto se desenvolve por meio de modificações da parede uterina durante o momento da implantação como mostrado no início do capítulo de resultados (Figura 7). Essa região era constituída por células deciduais típicas com formato irregular, citoplasma abundante e núcleo desenvolvido. Na região da decídua foi observada uma abundante vascularização resultante das chamadas artérias espiraladas (Figura 11).

Outro tipo celular identificado na decídua foi às células uterinas “Natural Killer” também chamadas: de uNK. Para identificá-las foi realizada a marcação imunohistoquímica com DBA-lectina e reação citoquímica com PAS, específicas para identificar na decídua esse tipo celular materno. As células uNK apresentaram núcleo esférico e citoplasma abundante repleto de grânulos PAS positivos. Essas células estavam sempre associadas às artérias maternas, apresentando uma relação muito íntima com esses vasos (Figura 11B).

A decídua apresenta inúmeras e importantes funções durante a placentação. A marcação com PCNA-3 revelou uma alta proliferação celular nessa região. Inúmeras células foram positivas para o anticorpo mostrando uma marcação predominantemente nuclear. Deve-se ressaltar que as células positivas para o PCNA-3 apresentaram uma relação muito íntima com as artérias maternas, abundantes na região da decídua (Figuras 11C-F).

Figura 11- Imagens evidenciando a região de decídua materna na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: A decídua apresentou uma intensa vascularização, onde destacam-se as artérias maternas espiraladas (AM). As células deciduais apresentaram núcleo pequeno e citoplasma abundante. Coloração hematoxilina e eosina. Em B: Reação imunohistoquímica para DBA-lectina. Notar as uNK – cells (células natural Killer) presentes ao redor das artérias maternas (AM). Fundo de hematoxilina. Notar em detalhe a reação positiva para PAS nas mesmas células (setas). Em C-F: Imunolocalização para PCNA-3. As células positivas (setas) encontram-se na maioria das vezes associadas às artérias maternas (AM) na região da decídua. O controle negativo foi realizado utilizando IgG como anticorpo primário (Figura F). Fundo de hematoxililina

5.2.4 Células Trofoblásticas Gigantes

As células trofoblásticas gigantes constituem um grupo de células muito interessante e que apresenta inúmeras e importantes funções durante todo o processo de placentação.

Na placenta de *Necromys lasiurus* essas células estavam presentes em regiões distintas da placenta. Um primeiro grupo foi identificado localizando-se nas bordas dos cortes (corte sagital-mediano) do disco placentário (Figuras 12 A e B). Outro grupo de células trofoblásticas gigantes foi localizado entre as zonas de espongiotrofoblasto e a decídua (Figura 12E), o qual limitava os tecidos de origem fetal (zona juncional) e os tecidos de origem materna (decídua).

Células trofoblásticas gigantes denominadas de sinusoidais foram identificadas na região do labirinto, essas na maioria das vezes foram observadas em íntimo contato com os espaços sanguíneos maternos (Figura 12D).

As células trofoblásticas gigantes independente da região em que as mesmas se localizavam na placenta, eram facilmente identificáveis, e caracterizaram-se por apresentar um núcleo bastante desenvolvido, volumoso, acidófilo e repleto de grânulos no interior do citoplasma, conferindo ao mesmo um aspecto granular (Figuras 12 C e D).

Figura 12- Imagens evidenciando a localização das células trofoblásticas gigantes presentes na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A e B: Nichos de células trofoblásticas foram identificados na margem lateral de cortes (sagital mediano) do disco placentário (círculo). Em C e D: Notar o núcleo desenvolvido que essas células apresentam. Na maioria das vezes o citoplasma é granular e relativamente pequeno. Em E: Outra população de células trofoblásticas (retângulo) foi identificada entre as regiões de espongiotrofoblasto (ESP) e a decídua (D) como uma faixa contínua interpondo-se entre essas duas regiões. Coloração: em A, B, D e E: hematoxilina e eosina e em C: reação imunohistoquímica para DBA-lectina

5.2.5 Placenta vitelina visceral e parietal

Durante a placentação, logo após a implantação, a primeira membrana que se forma com a finalidade de promover trocas metabólicas entre a mãe e o feto é o saco vitelino, sendo designada desse modo como placenta vitelina.

Nas fases iniciais de gestação observamos uma placenta vitelina invertida muito próxima à região de labirinto da placenta corioalantóidea, sendo identificadas duas membranas vitelinas distintas: a placenta vitelina visceral e a placenta vitelina parietal.

A placenta vitelina visceral mostrou diferenças morfológicas em regiões próximas à parede uterina, onde notamos uma íntima relação entre seus elementos constituintes e nas regiões distantes à parede do útero, onde a mesma encontrava-se então próxima ao disco da placenta corioalantóidea.

Segue-se separadamente a caracterização morfológica dessas membranas de acordo com a sua localização.

5.2.5.1 Placenta vitelina visceral próxima ao útero

Nas regiões onde o saco vitelino visceral localizava-se mais distante da placenta corioalantóidea, e por sua vez próximo à parede uterina, o mesmo apresentava um formato mais compacto na sua estrutura, deixando de apresentar seus vilos característicos (Figura 13). Além disso, foi observado um íntimo contato entre as células vitelinas e o epitélio uterino (Figura 13).

Nesses locais de proximidade entre a placenta vitelina visceral com a parede uterina notamos invaginações do epitélio uterino para dar melhor suporte à membrana vitelina (Figura 13C). O epitélio inicialmente cúbico nas regiões onde o saco vitelino não estava sobreposto torna-se colunar alto ou prismático com núcleo alongado. Essas modificações epiteliais estavam associadas à presença de vasos sanguíneos e glândulas. Através da reação imunocitoquímica para PAS, notamos a liberação de secreções na superfície das células epiteliais uterinas presentes nessa região (Figuras 13 D-F).

As células endodérmicas da porção visceral apresentaram formato circular ou cúbico. Numerosos microvilos foram observados na superfície apical dessas células nas regiões de proximidade ao epitélio endometrial (Figura 14).

Através da microscopia eletrônica de transmissão notou-se que as células endodérmicas apresentavam pouco citoplasma e núcleo ovóide. Grandes espaços intercelulares e vacúolos citoplasmáticos estavam presentes na camada endodérmica. Depósitos de glicogênio no interior do citoplasma dessas células também puderam ser observados (Figura 14).

A camada média do saco vitelino visceral era formada por células que constituíam um tecido mesodermal rico em vasos sanguíneos fetais conforme demonstrado pelas reações imunohistoquímicas para vimentina (Figura 14).

A camada mesotelial por sua vez era constituída por células de formato alongado. Essa camada apresentou células em proliferação conforme demonstrado pelas reações imunohistoquímicas para PCNA-3 (Figura 14).

Figura 13- Imagens evidenciando a sintopia entre o saco vitelino visceral (SVV) e a parede uterina (U) na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A e B: Microscopia de luz. Corte longitudinal de um botão gestacional onde nota-se regiões de contato (círculo) entre o SVV e o útero. Plac = placenta corioalantóidea. Em B: detalhe da região de aposição entre o saco vitelino visceral (SVV) e o útero (U) onde desenvolvem-se regiões de invaginação do epitélio uterino (setas). Coloração hematoxilina e eosina. Em C: Microscopia eletrônica de varredura do epitélio uterino (U) modificado com regiões mostrando invaginações (setas) na região de aposição com o saco vitelino visceral. Em D-F: detalhes das invaginações do epitélio uterino nas regiões de aposição com a placenta vitelina visceral (SVV. Em D: Nota-se que o epitélio uterino torna-se prismático (seta). Coloração hematoxilina e eosina. Em E: As invaginações epiteliais são rodeadas por glândulas vimentina positivas (setas). Em F: A reação com ácido periódico de Schiff (PAS) evidenciou a presença de atividade de secreção (setas) na superfície de contato entre o saco vitelino visceral (SVV) e o epitélio uterino (U)

Figura 14- Imagens evidenciando o saco vitelino visceral próximo à parede uterina na placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: Microscopia de luz. Notar o formato compacto que o saco vitelino visceral (SVV) apresenta nas regiões próximas ao epitélio endometrial da parede uterina (U). Coloração hematoxilina e eosina. Em B e C: Microscopia eletrônica de varredura da região de contato entre o SVV e a parede uterina. As células endodérmicas apresentaram formato cúbico e a superfície das mesmas era recoberta por microvilos, conforme observado na microscopia eletrônica de transmissão (Figura D). Em E e F: microscopia eletrônica de varredura das células endodérmicas. Grandes espaços intercelulares estão presentes no citoplasma (Figura E), bem como grânulos de glicogênio (G) e vacúolos celulares (V). Em G: Imunohistoquímica para vimentina evidenciando a intensa vascularização do SVV (setas). Em H: Células em proliferação são observadas na camada mesotelial do SVV conforme demonstrado pela imunomarcção para PCNA-3

5.2.5.2 Placenta vitelina visceral próxima à placenta corioalantóidea

A placenta vitelina visceral invertida é formada por células endodérmicas dispostas a formar inúmeras vilosidades que muitas vezes se ramificam. Essas vilosidades ficam voltadas para a placenta principal (corioalantóidea) e são sustentadas por um eixo de mesênquima fetal revestido por um epitélio simples de células de formato hexagonal agrupadas de tal maneira a formar inúmeros vilos, conforme observou-se por análises de microscopia eletrônica de varredura. Uma camada mesotelial formada por células achatadas mantinha contato com a membrana amniótica (Figura 15).

A placenta vitelina visceral corresponde a uma parede interna vascularizada por vasos sanguíneos vitelinos (Figura 15) e sua formação resulta justamente de modificações do saco vitelino durante a gestação.

Na microscopia eletrônica de transmissão foi observado que a membrana apical das células endodérmicas da placenta vitelina era revestida por microvilosidades, enquanto que no citoplasma houve um predomínio de vacúolos citoplasmáticos (Figura 15).

É notória a quantidade de vasos sanguíneos no interior da membrana vitelina. Esses vasos sanguíneos fetais importantes para o papel de hematopoiese desempenhado pelo saco vitelino formam as ilhotas vasculares do saco vitelino. Estruturalmente as ilhotas vasculares são constituídas por uma parede de endoderma, células endoteliais e mesotélio (localizado basalmente), onde no interior podem ser identificados os hemangioblastos.

Os vasos sanguíneos vitelinos possuem origem fetal e apresentam um endotélio vimentina-positivo (Figura 16).

As células endodérmicas da placenta vitelina quando submetidas às técnicas de imunohistoquímica para PCNA-3 apresentaram-se proliferativas e com depósitos de glicoproteínas no interior do citoplasma conforme mostrou a técnica de imunocitoquímica para ácido periódico de Schiff (Figura 16).

Figura 15- Placenta vitelina visceral de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A-D: Microscopia eletrônica de varredura. Notar que os vilos (V) que compõe a placenta vitelina visceral são sustentados por uma fina camada mesotelial (M) e formados por inúmeras células endodérmicas (Figuras A, B e C) de formato hexagonal (Figura D). Em E e F: Microscopia de luz. Coloração hematoxilina e eosina. Notar a abundância de vilos que constituem a placenta vitelina visceral (PVV) os quais ficam voltados para a placenta corioalantóidea. Lab = labirinto. Inúmeros vasos sanguíneos que formam ilhotas vasculares (setas) estão presentes no mesenquima vitelino. Em G e H: Microscopia eletrônica de transmissão. Notar as características ultraestruturais do saco vitelino visceral. No interior do citoplasma abundante das células endodérmicas estão presentes inúmeros vacúolos (V) celulares. Notar a vascularização (VS) presente no eixo de mesênquima que sustenta os vilos. A superfície dessas células é recoberta por microvilos (seta)

Figura 16- Histologia e esquema ilustrando as características estruturais das ilhotas vasculares do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A e B: detalhes das células endodérmicas, mesotélio, células endoteliais e hemangioblastos. Barras: 40 e 20 μm . Coloração: Hematoxilina e eosina. Em D: Imunohistoquímica para vimentina evidenciando a grande quantidade de vasos sanguíneos fetais (setas) presentes no mesenquima do saco vitelino visceral. As células endodérmicas apresentam intensa proliferação (setas) durante toda a gestação conforme evidenciado pela imunomarcagem para PCNA-3 (Figura E). Em F e G: Reação histoquímica positiva para o ácido periódico de Schiff (PAS) nas células que compõem os vilos da placenta vitelina (setas) evidenciando depósitos de glicoproteínas. Fundo de hematoxilina

Com base em análises de cortes semi-finos corados a quente em solução aquosa de azul de Toluidina a 1%, notamos a sintopia entre o âmnio e o saco vitelino na sua região de mesotélio (Figura 17A). Como já mencionado o mesotélio corresponde a uma delgada camada de células pavimentosas apoiadas em uma camada mais fibrosa. Essa última está em contato direto com o mesenquima do saco vitelino, onde identificamos vasos sanguíneos de diferentes calibres e as ilhotas vasculares (Figuras 17 A e B). Sobre o mesenquima, as células do endoderma do saco vitelino apresentaram formato cúbico com citoplasma repleto de vacúolos (Figuras 17 A e B).

Ao analisarmos com detalhe a membrana citoplasmática das diferentes regiões e células do saco vitelino sob a microscopia eletrônica de transmissão, identificamos morfologicamente microdomínios especializados de membrana plasmática, chamados de cavéolas, no mesotélio. Em determinadas regiões e cortes, essas estruturas levemente circulares apareciam como invaginações da membrana com uma fina região de diafragma aberta ou não para a superfície celular no meio exterior. O tamanho aproximado das cavéolas foi de 80 nm de diâmetro. Retículo endoplasmático rugoso foi observado abundantemente nas proximidades das cavéolas (Figuras 17 C e D).

Nas outras regiões do saco vitelino, endoderma e mesoderma, tais estruturas não foram visualizadas.

Figura 17- Em A e B: Corte semi-fino do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) corados por Azul de Toluidina. Notar sua constituição histológica pelo endoderma (EN) e mesotélio (seta MS) nas faces mais periféricas e pelo mesoderma (MS) no interior, onde nota-se ainda inúmeros vasos sanguíneos vitelinos (VV). Observar a sintopia entre o mesotélio (MS) do saco vitelino e a membrana amniótica (AM). Em C e D: Microscopia eletrônica de transmissão do mesotélio (MS) do saco vitelino. Notar a presença de cavéolas (círculo e CV) na membrana citoplasmática. Retículo endoplasmático rugoso (seta) abundante no citoplasma. NC: núcleo da célula mesotelial

A placenta vitelina parietal localizava-se aderida a membrana da face fetal da placenta corioalantóidea, recebendo suporte da membrana de Reichert conforme demonstrado nas análises por microscopia eletrônica de varredura (ver Figura 4).

Histologicamente a placenta vitelina parietal era formada por uma única camada de células colunares simples e núcleo basal. Suas células segundo as análises de marcação imunohistoquímica para PCNA-3 mostraram-se proliferativas (Figura 18).

Figura 18- Histologia da placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Em A: Imagem evidenciando a relação da placenta vitelina parietal (setas) constituída por células cúbicas simples, com a placenta corioalantóidea. Coloração: hematoxilina e eosina. Em B: Microscopia eletrônica de varredura mostrando o formato das células que constituem a placenta vitelina parietal. Essas células apresentam-se proliferativas (setas) conforme mostra a imunomarcação para PCNA-3 (Figura C)

7.2 CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS PROVENIENTES DO SACO VITELINO

5.3.1 Estabelecimento da cultura celular

No momento da coleta das placentas de *N. lasiurus* em estágios de meio e final de gestação, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, fragmentos do saco vitelino foram também coletados para o cultivo das células progenitoras provenientes do saco vitelino.

Após abrir o saco gestacional e expor o saco vitelino este foi coletado e lavado repetidas vezes em solução de PBS (5 vezes) com antibiótico estreptomicina/penicilina 5%. Em seguida os fragmentos foram acondicionados em meio de transporte contendo soro fetal bovino 10% (10 ml), antibiótico 5% (5%) e meio DMEM - F12 ou DMEM – High Glicose (85%). As amostras então foram mantidas em isopor com gelo para serem levados até o Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Chegando ao laboratório de Cultivo Celular, os fragmentos foram levados para a câmara de fluxo onde os mesmos foram lavados com meio de cultivo DMEM-High Glicose e estreptomicina/penicilina a 1%, utilizando seringa de 5 ml e agulhas 25X7. Em seguida os fragmentos foram macerados manualmente (fragmentação mecânica) com auxílio de uma lâmina de bisturi, até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos de saco vitelino. Estes fragmentos então foram implantados em placas de cultivo de 30x15mm de diâmetro (corning) contendo 5 ml de meio de cultivo. Foram testados para o cultivo dessas células os meios DMEM-High Glicose e DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) definido ou caracterizado e 1% de estreptomicina/penicilina (Tabela 3). Por fim as células foram incubadas em estufa a uma temperatura de 37,0 °C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Após 24 de incubação, as placas de cultivo foram analisadas em microscópio Olympus invertido.

Em cultura e usando os tratamentos mencionados anteriormente, as células liberadas pelos fragmentos de tecido do saco vitelino responderam de maneiras diferentes. A Tabela 3 ilustra em detalhe tais características.

Tabela 3- Tratamentos utilizados para estabelecer o melhor meio de cultivo a ser utilizado no cultivo das células-tronco aderentes oriundas do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)

Meio de Cultivo	Soro Fetal Bovino – SFB	Resultados
DMEM-High Glicose	10% SFB caracterizado	Pouca adesão seguida de morte celular
DMEM-High Glicose	10% SFB definido	Melhor e maior crescimento e adesão celular
DMEM-F12	10% SFB caracterizado	Pouca adesão seguida de morte celular
DMEM-F12	10% SFB definido	Crescimento moderado

Inicialmente o cultivo de saco vitelino era composto por inúmeras células flutuantes indiferenciadas de formato circular. Essas células hematopoiéticas abundantes no meio de cultivo eram oriundas dos fragmentos de saco vitelino que estavam no meio de cultivo (Figura 19).

Com a finalidade de diminuir o número de células hematopoiéticas e estimular o crescimento das células aderentes, o meio de cultivo foi desprezado diariamente juntamente com as células flutuantes, restando apenas o fragmento e as células que possuíam capacidade de adesão ao substrato.

Somente no sétimo dia após o início do cultivo foram identificadas colônias de células aderidas ao substrato. Essas pequenas colônias eram compostas por células com morfologia semelhante a fibroblastos. Após a identificação dessas colônias de células aderentes, passamos a trocar o meio de cultivo a cada 3 dias.

Passados 13 dias desde o início do cultivo das células progenitoras do saco vitelino, notou-se uma maior liberação dessas células semelhantes a fibroblastos ao redor dos fragmentos que foram mantidos nas placas de cultivo (Figura 19). É importante ressaltar que ainda estava havendo a liberação de células hematopoiéticas. A partir do 16º dia de cultivo, as colônias estavam bem estabelecidas com as células expandindo-se ao longo da placa (Figura 19). Ainda nesta fase o fragmento do saco vitelino continuava a liberar células progenitoras.

Figura 19- Fotomicrografias do fragmento do saco vitelino (FV) colocado em cultivo após 24 horas, 13 dias e 16 dias em meio DMEM-H. Notar o fragmento do saco vitelino (FV) em cultivo, o qual inicialmente é composto apenas por células hematopoiéticas. Aos 13 dias de cultivos começa haver a formação de colônias de células aderentes (setas) ao redor fo fragmento vitelino (FV) as quais possuem formato fibroblastóide. Com 16 dias de cultivo as colônias já estão bem estabelecidas com as células comunicando-se entre si. O fragmento vitelino continua a liberar células (circulo). Aumentos: 4x

Para suplementar o meio de cultivo a ser utilizado (DMEM-High Glicose e DMEM-F12) foram realizados testes com 2 tipos de soro fetal bovino: o definido e o caracterizado. Somente se mostrou viável para o cultivo deste tipo celular - proveniente do saco vitelino de *Necromys lasiurus*, o soro fetal bovino definido. Nesse tratamento adotado as células cresceram, aumentando as colônias e se mantiveram com a mesma morfologia indiferenciada ao longo do cultivo. Ao contrário do que ocorreu quando o meio de cultivo foi suplementado com soro fetal bovino caracterizado. Nesse tratamento além de ter havido pouca adesão celular, estas morriam após poucos dias de cultivo (Figura 20 A e B).

Ao longo do cultivo utilizando o meio DMEM-F12 algumas células tenderam a uma diferenciação espontânea após a segunda semana de cultivo, mudando sua morfologia. Essas células tornaram-se espidas apresentando prolongamentos citoplasmáticos alongados (Figura 20C).

Não houve diferença quanto à capacidade de obtenção de células progenitoras entre o saco vitelino das fases de meio e final de gestação, sendo que em cultura as células de ambas as fases gestacionais mantiveram as mesmas características de adesão e crescimento.

Figura 20- Fotomicrografias das células progenitoras liberadas pelo fragmento do saco vitelino cultivadas em meio DMEM-F12 (A) e DMEM-High Glicose (B) suplementado com soro fetal bovino caracterizado. Em A e B: Notar que ao testar o soro fetal bovino caracterizado as células não toleraram e morreram. Aumentos: em A e B: 4x. Em C: Fotomicrografias das células progenitoras do saco vitelino em meio DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino definido. Notar que algumas células tenderam a se diferenciar apresentando morfologia espraída com prolongamentos citoplasmáticos bem evidentes (setas). Aumento: 4x

5.3.2 Análise morfológica das células provenientes do cultivo do saco vitelino

A partir do 16º dia de cultivo pudemos identificar duas populações celulares distintas (Figura 19), células semelhantes a fibroblastos que fenotipicamente eram heterogêneas entre si, embora na sua maioria apresentassem formato fusiforme com prolongamentos citoplasmáticos. Outra população identificada correspondia a células semelhantes à células epiteliais. Essas apresentavam formato arredondado, citoplasma esparso e núcleo reduzido. Não era raro durante a observação dessas células ao microscópio identificarmos células epiteliais com mais de um núcleo. Notou-se uma característica granular no interior do citoplasma dessa população celular (Figuras 21 e 22). Quando analisadas sob a citometria de fluxo, também notamos duas populações com tamanhos e granulosidades diferentes. Uma primeira população menos expressiva em número (6,5%) era composta por células maiores e de grande granulosidade. E uma segunda população, mais abundante (92,13%) formada por células pequenas e de pouca granulosidade (Figura 23).

As células hematopoiéticas nesse momento mostravam uma redução na sua abundância, diminuindo gradativamente o seu número.

Essas características, tanto na distinção das populações celulares quanto na morfologia das células que compunham essas populações distintas de células aderentes se manteve ao longo do cultivo, embora as células com características epiteliais tenham tendido a diminuir a sua abundância.

Após a tripsinização, as células fibroblastóides eram mais facilmente identificadas, devido à sua abundância, confluência e homogeneização da cultura.

Figura 21- Fotomicrografias das células progenitoras liberadas pelo fragmento do saco vitelino (FV) colocado em cultivo após 20 dias em meio DMEM-High Glicose. Em A: Notar a abundância de células semelhantes a fibroblastos liberadas no meio pelo fragmento. Em B, C e D: Detalhe da morfologia que essas células apresentaram: formato fusiforme, núcleo desenvolvido com pouco citoplasma ao redor e na maioria das vezes, com prolongamentos citoplasmáticos (setas). Aumentos: em A: 4x, B, C e D: 10x

Figura 22- Fotomicrografias das células progenitoras liberadas pelo fragmento do saco vitelino (FV) em meio DMEM-High Glicose. Notar em detalhe as características das duas populações distintas identificadas. Em A e B: Células semelhantes a fibroblastos, com núcleo central e citoplasma alongado. Em C e D: detalhe as células com característica de células epiteliais. Estas são maiores que as anteriores, apresentam citoplasma volumoso, núcleo pequeno, esférico e centralizado. Aumentos: 4x

Figura 23- Análise morfológica das células progenitoras oriundas do saco vitelino por citometria de fluxo. Duas populações com tamanhos e granulosidades diferentes puderam ser identificadas. A população R1 é composta por células de maior tamanho e granulosidade e representa 6,5% da população de células do saco vitelino. A maioria das células vitelinas (92,13%) corresponde a células pequenas e de pouca granulosidade

5.3.3 Teste de Viabilidade de Criopreservação

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas do saco vitelino de *Necromys lasiurus* foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células derivadas do cultivo do saco vitelino derivadas da digestão através da enzima trypse a 0,25%, foram ressuspensas em 1,5 ml de meio de congelamento e igualmente distribuídos em criotubos (corning). Os criotubos (corning) foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde algumas amostras permanecem armazenadas.

Quando necessário, as células foram submetidas ao processo de descongelamento rápido no banho-maria a 37°C .

Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida para tubos de polipropileno de 15 ml com meio de cultivo DMEM-High Glicose suplementado com soro fetal bovino definido. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo para expansão das células, as quais foram plaqueadas novamente e mantidas em cultivo.

Em cultivo, após o descongelamento, as células derivadas do saco vitelino mantiveram a mesma morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 24) crescendo uniformemente e de maneira confluyente em placas e ou garrafas preenchidas com 4 - 5 ml de meio de cultivo.

Figura 24- Após o descongelamento as células-tronco provenientes do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) mantiveram a mesma morfologia, indiferenciada e semelhantes à fibroblastos. Meio de cultivo: DMEM-High Glicose suplementado com soro fetal bovino definido. Aumento: 4x

5.3.4 Ensaio de unidade formadora de colônia

Para testar a habilidade das células progenitoras do saco vitelino com morfologia semelhante a fibroblastos em formar colônias (ensaio CFU-f), as células foram mantidas em placas de cultivo de 90 mm de diâmetro durante 16 dias ainda na primeira passagem (Figura 25). Decorrido esse período, notou-se a formação de 12 colônias. No entanto, as colônias formadas eram heterogêneas quanto aos seus respectivos diâmetros, sendo notado raramente (apenas 4 vezes) colônias com alta densidade celular, ou seja, com mais de 50 células por colônia. As células dessas colônias eram morfológicamente homogêneas e apresentavam formato semelhante a fibroblastos. O núcleo arredondado normalmente estava localizado centralmente no citoplasma esparso da célula. As células localizadas mais próximas à periferia das colônias tendiam a ser maiores e com formato mais estrelado, devido aos inúmeros prolongamentos citoplasmáticos.

Figura 25- Fotomicrografia do ensaio de unidade formadora de colônia das células progenitoras do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) em P1, após 16 dias de cultivo. Em A: Colônias obtidas a partir de 10^3 células plaqueadas em placas de cultivo de 90 mm de diâmetro. Em B: Notar a alta densidade celular organizadas sob forma de colônias. Coloração: Cristal de Violeta

5.3.5 Ensaio Colorimétrico de Viabilidade Celular (MTT)

O MTT foi realizado a partir do primeiro repique celular, assim que as células atingiram uma confluência de 80% (2 dias após o plaqueamento) em cultivo com meio DMEM-HIGH. Inicialmente foram utilizadas 1×10^5 células, as quais foram expandidas, a fim de observar a evolução do crescimento e viabilidade celular.

O Gráfico 1 ilustra a dinâmica do crescimento das células-tronco vitelinas acompanhadas durante 12 dias em amostras quadruplicatas. Observa-se pela curva de crescimento que as células vitelinas não apresentaram um crescimento constante ao longo da análise. De maneira que a inconstância no seu crescimento (primeiros 3-7 dias) somente foi superada a partir do 7º dia, quando as células vitelinas apresentaram um crescimento progressivo. A população total de células atingiu seu ápice no 10º dia da análise apresentando a partir de então um ligeiro declínio.

Gráfico 1- Ensaio de proliferação colorimétrico de viabilidade celular MTT do saco vitelino de *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae) obtido durante 12 dias de avaliação em amostras quadruplicatas

7.3 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

5.4.1 Imunocitoquímica

O imunofenótipo das células provenientes do saco vitelino foi realizado através de ensaios de imunofluorescência com anticorpos específicos para células-tronco de origem mesenquimal (vimentina, β -tubulina, citoqueratina 18, Stro-1, CD90, CD105 e CD73), células hematopoiéticas (CD34 e CD48), precursor de células hematopoiéticas (CD117), pluripotência (Oct-4), fator de crescimento vascular (VEGF) e proliferação celular (PCNA-3).

A fim de caracterizar a arquitetura e estrutura das células provenientes do saco vitelino e verificar se as mesmas eram de origem mesenquimal, realizamos marcações para as fibras citosólicas que constituem o citoesqueleto celular. As células apresentaram reações imunopositivas para a vimentina (Figura 26A) e citoqueratina (Figura 26C), marcadores específicos para filamento intermediário e também para β -tubulina (Figura 26B), o qual é específico para microtúbulos. Além disso, as células apresentaram imunopositividade para Stro-1 (Figura 26D).

Ainda com o intuito de verificar o perfil de expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais, utilizamos os anticorpos CD90, CD105 e CD73, apresentando as células oriundas do saco vitelino imunopositividade para ambos (Figuras 27A, B e C, respectivamente).

Verificamos ainda que as células apresentaram reação imunopositiva para CD117, precursor de células hematopoiéticas (Figura 27D). No entanto, quando testado os anticorpos CD34 e CD48, específicos para células hematopoiéticas obtiveram-se reações negativas (Figuras 27E e F, respectivamente).

Ambas as reações positivas podem ser observadas pela coloração verde na membrana celular, devido à utilização do anticorpo secundário FITC. Os núcleos foram corados por DAPI (azul).

Quando testados anticorpos específicos para células pluripotentes, notou-se reações positivas de imunofluorescência do perfil de expressão dos marcadores Oct-4 e Nanog (Figuras 28A e B, respectivamente). A imunolocalização de ambos ocorreu na região perinuclear.

As células vitelinas apresentaram reações imunopositivas para PCNA-3, evidenciada também na região perinuclear, sugerindo que as mesmas estavam em

proliferação (Figura 28C) e para o fator de crescimento de endotélio vascular VEGF (Figura 28D), evidenciado na membrana e citoplasma das células.

Figura 26- Imunocitofluorescência do perfil de expressão dos marcadores de células-tronco mesenquimais: vimentina, β -tubulina, citoqueratina 18 e Stro-1 em células do saco vitelino de *Necromys lasiurus*. Notar em A-C a reação imunopositiva para vimentina e citoqueratina (proteínas de filamento intermediário) e β -tubulina (microtúbulos) no citoesqueleto celular. Em D: as células também apresentaram reação imunopositiva para Stro-1

Figura 27- Imunocitofluorescência do perfil de expressão dos marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90, CD105 e CD73), precursor de células hematopoiéticas (CD117) e células hematopoiéticas (CD34 e CD48) em células-tronco obtidas do saco vitelino de *Necromys lasiurus*. Notar as reações imunopositivas para os marcadores de células mesenquimais (Imagens: A-C) e precursor de células hematopoiéticas (Imagem D) e negativa para os marcadores de células-tronco hematopoiéticas (Imagens: E e F)

Figura 28- Reações positivas de imunocitofluorescência do perfil de expressão dos marcadores de pluripotência (Oct-4 e Nanog) em A e B, respectivamente e proliferação celular (PCNA-3) em C, na região perinuclear em células do saco vitelino de *Necromys lasiurus*. Em D: observa-se a reação citoplasmática positiva para VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular)

5.4.2 Citometria de fluxo

As análises da caracterização imunofenotípica das células vitelinas aderentes por citometria de fluxo indicaram níveis consideráveis de expressão para marcadores de células-tronco mesenquimais e citoesqueleto celular, como a vimentina (36,6%), β -tubulina (49,1%), citoqueratina 18 (39,2%) e Stro-1 (44,4%), (Figura 29). Nessa mesma linha, as células vitelinas também apresentaram significativas expressões de CD90 (66,8%), CD105 (59,7%) e CD73 (38,4%), os quais também sugerem linhagens mesenquimais (Figura 30).

Com menor expressão (29,3%), porém não menos significativa, notou-se a reação positiva para o marcador de células precursoras de células hematopoiéticas CD117 (Figura 30).

Quando testados marcadores de células hematopoiéticas verificou-se que não houve marcação significativa para os anticorpos CD34 e CD45 (Figura 31). De modo que apenas 2,1% do total de células nas amostras apresentaram reação positiva para os anticorpos mencionados. No entanto, nível considerável de expressão (34,8%) foi observado para o também marcador de células hematopoiéticas CD48 (Figura 31).

As células-tronco do saco vitelino expressaram também reação positiva para os marcadores de pluripotência testados, Oct3/4 (45%) e Nanog (28,6%). Também foram identificadas populações positivas para o fator de crescimento de endotélio vascular VEGF (45,6%), assim como foi evidenciado o nível considerável (49,2%) de atividade proliferativa dessas células através do anticorpo PCNA-3 (Figura 32).

Figura 29- Histogramas da imunofenotipagem das células aderentes do saco vitelino de *N. lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) por citometria de fluxo. Notar a expressão antigênica de glicoproteínas de superfície para células-tronco mesenquimais e citoesqueleto celular (vimentina, β -tubulina, citoqueratina 18 e Stro-1)

Figura 30- Histogramas da imunofenotipagem das células aderentes do saco vitelino de *N. lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) por citometria de fluxo. Notar a expressão antigênica de glicoproteínas de superfície para células-tronco mesenquimais (CD90, CD105 e CD73) e precursor de células hematopoéticas (CD117)

Figura 31- Histogramas da imunofenotipagem das células aderentes do saco vitelino de *N. lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) por citometria de fluxo. Notar a pouca expressão antigênica quase nula de glicoproteínas de superfície para os marcadores de células-tronco hematopoéticas CD34 e CD45, havendo expressão significativa somente do CD48

Figura 32- Histogramas da imunofenotipagem das células aderentes do saco vitelino de *N. lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) por citometria de fluxo. Notar a expressão antigênica de marcadores de pluripotência (Oct^{3/4} e Nanog), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e proliferação celular (PCNA-3)

O gráfico 2 ilustra de maneira comparativa os níveis percentuais de expressão de cada anticorpo utilizado na caracterização imunofenotípica das células-tronco do saco vitelino de *N. lasiurus* destacando-se principalmente os níveis consideráveis de expressão para marcadores de células-tronco mesenquimais (Vimentina, β -Tubulina, Citoqueratina 18, Stro-1, CD90, CD105 e CD73) .

Gráfico 2- Valores relacionados à expressão dos marcadores utilizados na imunofenotipagem das células progenitoras do saco vitelino de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae) obtidos por citometria de fluxo

5.5 TESTE DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células derivadas do saco vitelino na 6ª passagem foram induzidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica pelo cultivo em meio específico para cada diferenciação. Após a indução notou-se que as células oriundas do saco vitelino de *N. lasiurus* foram capazes de se diferenciar nas três linhagens mesenquimais após 21 dias de tratamento.

Diferentemente das células mantidas como controle, as células diferenciadas em adipócitos estavam organizadas em pequenos agregados celulares. O núcleo inicialmente central no interior do citoplasma (controle), nos adipócitos estava deslocado e comprimido contra a membrana celular, uma vez que no interior do citoplasma inúmeros vacúolos de gordura podiam ser facilmente observados pela coloração de Sudan II – escarlate, específica para células de gordura (Figuras 33A e B).

As células diferenciadas em osteócitos foram evidenciadas pela coloração de Von Kossa. As células inicialmente com morfologia fibroblastóide, após a indução adquiriram morfologia poligonal com locais de ossificação no citoplasma. A formação de um material extracelular calcificado, matriz óssea, também ficou evidente (Figuras 33C e D).

A diferenciação condrogênica foi evidenciada pela formação de uma micromassa celular no cultivo em suspensão. Após o processamento histológico desse tecido e coloração pela técnica de Tricrômio de Masson, notou-se no parênquima tecidual que as células até então fibroblastóides, assumiram uma morfologia mais arredondada, caracterizando a diferenciação condrocitária, além disso, houve a formação de regiões semelhantes às lacunas condrocitárias (Figuras 34A e B). A composição do material extracelular que constituía uma matriz formada por fibras ricas em colágeno foi evidenciada pela coloração de Picrosirius (Figura 34C).

A área ocupada pelo colágeno foi quantificada pelo Programa ImageJ, em cortes corados por Picrosirius analisados sob luz polarizada, obtendo-se 42,3% (Figura 34D).

Figura33- Diferenciações adipogênica e osteogênica das células do saco vitelino de *N. lasiurus*. Em A: Diferenciação em adipócitos. Notar as vesículas de gordura (seta) presentes no interior do citoplasma coradas por Sudan II-escarlate. B: Controle negativo. Em C: Diferenciação osteogênica evidenciada pela coloração de Von Kossa. Notar regiões de calcificação (seta) e formação de matriz extracelular (MT). D: Controle negativo

Figura 34- Diferenciação condrogênica das células do saco vitelino de *N. lasiurus*. Em A: Diferenciação em condrócitos (CD). Notar a formação de um tecido cartilaginoso formado por condrócitos entremeados por fibras de colágeno evidenciadas pela coloração de Tricrômio de Masson. B: Controle negativo. Em C: Arranjo das fibras colágenas (setas) sob a coloração de Picrosirius. Em D: A área ocupada pelo colágeno corresponde a 42,3% (ImageJ)

5.6 ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS DE SACO VITELINO

Semanalmente, os camundongos imunossuprimidos (Nude) nos quais as células do saco vitelino foram inoculadas no membro pélvico esquerdo (Figura 35A) foram avaliados clinicamente para observar se ocorria alguma formação e desenvolvimento tumoral. Até a 8ª semana nenhuma formação tumoral foi notada macroscopicamente (Figura 35B).

Passado os 60 dias (oito semanas) em que as células do saco vitelino foram inoculadas nos 2 camundongos imunossuprimidos os animais foram eutanasiados para coleta de amostras do músculo bíceps femural, fígado, pulmão, rim e tecido adiposo da região abdominal para posterior análise histopatológica por microscopia de luz.

Ao avaliar a musculatura do membro pélvico direito, local de inoculação das células, notou-se a ausência de formação tumoral bem como a integridade histológica do tecido muscular estriado esquelético (Figuras 35C e D).

Ao analisar as amostras de tecidos coletadas do: fígado (Figuras 35E e F), pulmão (Figuras 35G e H), rim (Figuras 35I e J) e tecido adiposo (Figuras 35L e M) da região abdominal, observamos que não houve crescimento metastático tumoral, mostrando a integridade estrutural característica dos respectivos órgãos.

Figura 35- Análise do potencial tumorigênico das células obtidas do saco vitelino injetadas em camundongos imunossuprimidos. Em A e B: Local da inoculação intramuscular das células no membro pélvico esquerdo e o mesmo sendo dissecado 60 dias após a inoculação celular. Nota-se tanto macroscopicamente (em B) quanto através das análises histopatológicas de tecidos de diferentes órgãos (C e D: músculo bíceps femoral; E e F: fígado; G e H: pulmão; I e J: rim; L e M: tecido adiposo da região abdominal) que não houve formação tumoral, tendo os referidos órgãos mantido sua estrutura e arranjo celular característico. VCL: veia centro lobular, BL: bronquíolo, A: alvéolo, V: vasos sanguíneos, seta: cápsula fibrosa (tecido conjuntivo) revestindo o rim e GL: glomérulo renal

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Devido às muitas variações morfológicas presentes na placenta e durante o processo de placentação dentro do grupo dos roedores, no que tange à estrutura da placenta, barreira placentária, invasão trofoblástica, decídua, células trofoblásticas gigantes e placenta vitelina optamos por discutir nossos resultados somente com espécies de roedores da Superfamília Muroidea (onde taxonomicamente esta incluída a Subfamília Sigmodontinae), a fim de gerar dados mais concretos e objetivos. Além disso, dividimos a discussão em dois tópicos distintos, sendo o primeiro relacionado à placenta e placentação e o segundo relacionado ao potencial do saco vitelino como fonte de células-tronco.

6.1 PLACENTA E PLACENTAÇÃO

Durante a passagem da oviparidade para a viviparidade, uma das mudanças mais significativas foi o estabelecimento e desenvolvimento de estruturas que pudessem suprir as necessidades do embrião ou feto, durante o seu desenvolvimento dentro do útero materno. Uma serie de mudanças no âmbito morfológico e fisiológico ocorreram gradativamente para que esse fato se estabelecesse como conhecemos hoje, com isso, como resultado do sucesso evolutivo que a Infra-classe Placentalia obteve observa-se sua grande diversidade em número de espécies. Concomitantemente, variações no que tange à morfologia da placenta e seus anexos tem levado pesquisadores do mundo todo a desenvolverem trabalhos que abordem diferentes aspectos da placentação, como a relação filogenética entre as membranas envolvidas durante o processo de placentação dentro de um grupo específico ou comparando com diferentes táxons (LUCKETT, 1993; CARTER, 2001; MESS, 2003; CARTER e ENDERS, 2004), análises dos genes envolvidos na placentação (CROSS et al., 2003; DUPRESSOIR et al., 2011; SALBAUM et al., 2011; VERNOCHE et al., 2011; DUPRESSOIR et al., 2012), aspectos relacionados à morfofisiologia da placenta e patologias (MALANDRO et al., 1996; TISSOT VAN PATOT et al., 2010; HIGGINS et al., 2011), dinâmica do desenvolvimento celular e das diferentes regiões da placenta durante a

gestação (COAN et al., 2004; COAN et al., 2010), potencial da placenta como fonte de células-tronco (FUKUCHI et al., 2004), entre outros aspectos.

Frente à enorme variabilidade placentária existente dentre os diferentes grupos de animais, como relatado por Leiser e Kaufman (1994), os roedores, uma vez mais se mostram como interessantes modelos experimentais para se estudar a placentação e correlacionar os resultados ao modelo do homem, devido às semelhanças compartilhadas por ambos, como discutido por Carter (2007).

A espécie de roedor estudada neste projeto, *Necromys lasiurus*, pertence à Família Cricetidae e Subfamília Sigmodontinae. Essa é uma das Subfamílias mais diversificadas, sendo a segunda maior entre os roedores da Superfamília Muroidea, com cerca de 380 espécies, distribuídas em 74 Gêneros e 8 Tribos (REIG, 1984; NOWAK, 1999; MUSSER; CARLETON, 2005; POOR, 2005). Embora esse grupo seja composto, na sua maioria, por espécies de roedores silvestres e por essa razão normalmente não costumam entrar em contato com humanos, atividades como desmatamento, queimadas e o avanço da agricultura para áreas anteriormente ocupadas por vegetação nativa, observa-se como resultado o avanço na disseminação de síndromes como a hantavirose e a peste (CANTONI et al., 2001; ARMIEN et al., 2004; GOODIN et al., 2009). Em humanos, a hantavirose segundo estudos de Allen et al. (2006) resulta em febre hemorrágica com síndrome renal (Europa e Ásia) ou síndrome pulmonar (Américas). A síndrome pulmonar cardiovascular por hantavírus e a peste (infecção pela *Yersinia pestis*) são zoonoses que ocorrem no Brasil, ambas compartilham as mesmas espécies de roedores como reservatórios, dentre essas espécies encontram-se o *Necromys lasiurus* (CHIORATTO et al., 2010).

Além de sua importância no contexto epidemiológico, *Necromys lasiurus* apresenta potencial para ser utilizado como modelo experimental em pesquisas devido a suas características biológicas. No entanto, pouco se sabe sobre suas características reprodutivas (BRASIL, 2002). Fato este que nos levou a escolher essa espécie para conduzir este estudo.

De um modo geral, a placentação na Subfamília Sigmodontinae tem sido pouco estudada. Com isso, as informações a cerca da placentação em cricetídeos se limita a descrições de um número muito pequeno de espécies, frente à grande diversidade desse grupo. Como exemplos tem-se o *Mesocricetus auratus* (CARPENTER, 1972, 1975; PIJNENBORG, 1975); e os gêneros *Lemmus*,

Dicrostonyx, *Clethrionomys*, *Microtus* e *Peromyscus*, (subfamília Arvicolinae) descritos por King e Hastings (1977). Mais recentemente vários trabalhos tem sido realizados com a espécie *Calomys callosus*, o qual tem sido inclusive utilizado como modelo experimental para diferentes propósitos patológicos e outras doenças (FERRO; BEVILACQUA, 1994; FARIA; BEVILACQUA, 1995; FERRO et al., 1999; LIMONGI; FERRO, 2003).

Além disso, foi descrito recentemente por nosso grupo (FAVARON et al., 2011) a morfologia da placenta de cinco outras espécies a Subfamília Sigmodontinae, *Oryzomys subflavus*, *Oryzomys megacephalus*, *Oryzomys* sp., *Oligoryzomys* sp., e do próprio *Necomys lasiurus*. Embora tenhamos conseguido descrever a maioria das características que caracterizam a placenta desse grupo, não pudemos aprofundar nossos estudos fazendo uso de técnicas mais refinadas por imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. No entanto, pela disponibilidade de amostras de placentas da espécie utilizada nessa tese (*Necomys lasiurus*) oriundas de um grupo mantido em cativeiro no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em Mossoró-RN, foi possível descrever com maior riqueza de detalhes não somente à placenta, como também as características do processo de placentação.

Baseando-se nesses trabalhos, podemos notar que as espécies de roedores da Família Cricetidae mantiveram ao longo da evolução muitas das principais características relacionadas à placenta e placentação. Quando notamos alguma variação, essas são muito sucintas o que nos faz aferir sobre o grau avançado que essas espécies atingiram dentro do processo de evolução. Assim como em murídeos e outros cricetídeos, a placenta corioalantóidea de *N. lasiurus* consiste de três zonas bem definidas: o labirinto, a zona juncional e a decidua, com um saco vitelino invertido ou placenta vitelina persistindo até o final da gestação. É justamente por conta dessas semelhanças no design básico da placenta do *N. lasiurus* com a placenta do camundongo, para o qual o desenvolvimento placentário e as diferentes linhagens celulares já são bem conhecidos (ADAMSON et al., 2002; COAN et al., 2006; HU; CROSS, 2010; SENNER; HEMBERGER, 2010; TESSER et al., 2010; ZHANG et al., 2011) que nossos resultados são discutidos com essa espécie bem como com outros murídeos e cricetídeos (SANSOM, 1922; ENDERS, 1965; PIJNENBORG et al., 1974 e KING; HASTINGS, 1977).

A placenta corioalantóidea do *Necromys lasiurus* é responsável por promover uma relação hemocorial entre o sangue materno e o fetal. Essa apresentou formato discoidal, característico, quando comparada a outras espécies de roedores (MOSSMAN, 1987), sendo, portanto classificada como tipo zonaria discoidal (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O labirinto corresponde à região mais desenvolvida da placenta, ocupando o maior volume dentro do parênquima placentário. Essa região é composta por canais de sangue materno limitados por trabéculas de trofoblasto, que correm paralelas aos capilares fetais. Assim como em outros roedores murídeos (ENDERS, 1965) e cricetídeos (ENDERS, 1965; CARPENTER, 1972; CARPENTER, 1975; KING; HASTINGS, 1977; LIMONGI; FERRO, 2003) existem três camadas de trofoblasto interpostas entre a circulação materna e a fetal.

Como proposto por Enders (1965) as placentas do tipo corioalantóidea hemocorial frequentemente são classificadas de acordo com o número dessas camadas de tecido que se interpõe entre o sistema vascular fetal e o materno na região de labirinto. Existem três modelos de barreira-placentária hemocorial, ou tecidos de interdigitação materno-fetais, o tipo hemomonocorial, o hemodicorial e o hemotricorial (LEISER; KAUFMANN, 1994), sendo, portanto, uma característica marcante para os murídeos e cricetídeos a presença de uma barreira-placentária do tipo hemotricorial. Detalhes da estrutura da barreira-placentária como variações na sua espessura, relação entre as camadas e sua celularidade foram similares aos descritos por King e Hastings (1977) no qual os autores demonstraram através da ultraestrutura a barreira hemotricorial dos gêneros *Lemmus*, *Dicrostonyx*, *Clethrionomys*, *Microtus* e *Peromyscus*, que também pertencem a Família Cricetidae. E como demonstrado por Limongi e Ferro (2003) para a espécie *Calomys callosus*, espécie também presente na mesma família. Nestas espécies foram observadas três camadas de células trofoblásticas, as quais foram denominadas de camada trofoblástica I, II e III (partindo da proximidade com os elementos sanguíneos maternos em direção aos capilares fetais), além do endotélio do capilar fetal propriamente dito, assim como também foi descrito no hamster dourado (*Cricetus auratus*) segundo Carpenter (1972, 1975) e para os gêneros *Oryzomys* e *Oligoryzomys* (FAVARON et al., 2011).

No camundongo embora todas as três camadas trofoblásticas sejam derivadas da mesma linhagem celular (HU; CROSS, 2010) elas apresentam distintos moldes quanto a sua expressão gênica (SIMMONS et al., 2007).

Na região do labirinto identificamos ainda células trofoblásticas gigantes, as quais localizavam-se margeando os espaços sanguíneos maternos. As células trofoblásticas gigantes representam o primeiro tipo celular definitivo a se estabelecer na placenta logo após a implantação (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989; HEMBERGER, 2007) desenvolvendo importantes funções no início da gestação relacionadas ao processo de invasão incluindo a modulação de hormônios e atividades de fatores de crescimento (SOLOVEVA; LINZER, 2004; HU; CROSS, 2010). Com o avanço de técnicas de biologia molecular e expressão gênica sabe-se hoje que essas células apresentam diferentes subtipos, os quais surgem em diferentes momentos da gestação (SIMMONS et al., 2007). Provavelmente as células trofoblásticas gigantes que identificamos no labirinto são equivalentes às células trofoblásticas gigantes sinusoidais identificadas na placenta do camundongo com base na expressão gênica e poliploidia (COAN et al., 2004; SIMMONS et al., 2007).

Assim como na placenta de outros murídeos e cricetídeos (PIJNENBORG et al., 1974, GEORGIADES et al., 2002; HU; CROSS, 2010) uma zona juncional proeminente desprovida de vasos fetais, porém, com grandes espaços sanguíneos maternos lineados por trofoblasto foi identificado na placenta do *N. lasiurus*. Dois tipos celulares distintos de trofoblasto foram identificados: o espongiotrofoblasto e as células de glicogênio. Durante muito tempo acreditou-se que ambos os tipos celulares tinham uma origem comum, no entanto, hoje é sabido que as células glicogênicas são derivadas de um precursor no cone ectoplacentário, expressando protocaderina 12 (BOUILLOT et al., 2006).

Na placenta do camundongo aos 16.5 dias de gestação cerca de 40% da zona juncional corresponde a células de glicogênio, as quais diminuem com o avanço da gestação (COAN et al., 2006). A dinâmica do volume ocupado por essas regiões e das células que as constituem durante a gestação tem recebido especial atenção dos pesquisadores por resultar em dados que contribuem para um melhor entendimento de processos relacionados à morfologia funcional da placenta. Como demonstrado para alguns roedores murídeos o desenvolvimento normal dessas regiões sob influências de fatores internos e externos, tais como patologias, restrição

nutricional, uso de drogas e poluição pode sofrer alterações quanto à suas proporções (MALANDRO et al., 1996; ROBERTS et al., 2001; MOHALLEN et al., 2005; VERAS et al., 2008; COAN et al., 2010).

As clássicas células trofoblásticas gigantes da placenta dos roedores, primeiramente reconhecidas por seu grande tamanho e alto grau de poliploidia (ZYBINA; ZYBINA, 2005) tem sido agora chamadas de células trofoblásticas gigantes parietais (SIMMONS et al., 2007). Uma pequena quantidade delas, as vezes chamadas de células gigantes primárias são derivadas do trofoectoderma mural, porém a maioria tem origem de linhagem Tpbpa-negativas do trofoectoderma polar (HU; CROSS, 2010). Assim como no camundongo, na placenta de *N. lasiurus*, elas formam uma camada contínua que limita os tecidos maternos e fetais, entre a decidua e a zona juncional. No entanto, no *N. lasiurus* identificamos outra população, bastante volumosa de células trofoblásticas gigantes nas margens do disco placentário (em cortes longitudinais) para a qual não encontramos dados na literatura para murídeos nem para outras espécies de cricetídeos a não ser para os gêneros *Oryzomys* e *Oligoryzomys* anteriormente descritos por nosso grupo (FAVARON et al., 2011).

Esse é um dos tipos celulares da placenta mais interessantes e intrigantes quanto a suas muitas e importantes funções durante toda a gestação. Primeiramente as funções das células trofoblásticas gigantes estão relacionados com a invasão do endométrio uterino e mais tarde estão envolvidas com o rompimento dos vasos sanguíneos maternos, para estabelecer a relação hemocorial. Possuem ainda característica invasiva e angiogênica, atuam na remodelação arterial, transferência de nutrientes, síntese de hormônios, sendo ainda vasodilatadoras, fagocitárias, além de apresentarem atividade imune (HEMBERGER, 2007).

A extensão da invasão do trofoblasto nos vasos sanguíneos maternos difere entre os roedores murídeos (VERCRUYSE et al., 2006). É sabido que no camundongo a invasão trofoblástica é limitada aos vasos da parte fetal da placenta (REDLINE; LU, 1989). Por outro lado, no rato, a invasão trofoblástica pela rota endovascular desempenha um importante papel na remodelação das artérias espiraladas uterinas (VERCRUYSE et al., 2006; CALUWAERTS et al., 2005). Certamente a invasão das artérias maternas pelo trofoblasto ocorre no golden hamster, um roedor cricetídeo, como discutido por Pijnenborg et al. (1974, 1975). No entanto, em nossas análises não encontramos células positivas para citoqueratina

na parede das artérias espiraladas e o endotélio desses vasos estava completamente intacto. Além disso, células positivas para citoqueratina não foram encontradas no triângulo mesometrial (FAVARON et al., 2011), o que nos faz sugerir que essa questão é um aspecto que precisa ser sistematicamente explorado.

Na região da decidua pudemos identificar através da associação de marcação por PAS e DBA lectina uma população leucocitária especial, denominada de células natural killer uterinas (células uNK). Na gestação do homem elas são responsáveis pelas primeiras transformações associadas às artérias espiraladas, as quais ocorrem principalmente pela invasão do trofoblasto (HARRIS, 2010). No camundongo, elas desempenham um papel de extrema importância na adaptação das artérias maternas, as quais apresentam falhas quando na ausência das células uNK (CROY et al., 2000). Nos cricetídeos a presença de células uNK nas paredes das artérias espiraladas foi primeiramente demonstrado no hamster dourado (PIJNENBORG et al., 1974). Posteriormente, demonstramos que as células uNK representam um grupo numeroso na placenta dos roedores sigmodontes, estando as mesmas associadas às artérias espiraladas (FAVARON et al., 2011). Com isso podemos sugerir que as mesmas desempenham um importante papel na remodelação dos vasos maternos, assim como demonstrado experimentalmente no camundongo.

Alguns autores (KING; ENDERS, 1970; KAUFMANN, 1981; MESS, 2007) consideram que o estudo do transporte materno-fetal por si só já é bastante complexo, no entanto, sua complexidade aumenta ainda mais quando se considera a existência concomitante de dois tipos de placenta (a corioalantóidea e a vitelina) durante a gestação. Em nossos resultados encontramos as duas placentas presentes concomitantemente durante toda a gestação do *Necromys lasiurus*.

Com relação à placenta vitelina pudemos encontrar tanto a placenta vitelina parietal quanto a placenta vitelina visceral invertida. Nos roedores a placenta vitelina é estruturalmente diversificada entre as espécies, porém pouco se sabe ainda sobre os processos que envolvem as trocas entre a mãe e o feto durante a gestação através do saco vitelino (MOSSMAN, 1987; ENDERS; CARTER, 2006). A placenta vitelina desempenha importantes funções no desenvolvimento do embrião/feto, antes e depois da formação da placenta corioalantóidea (ENDERS; CARTER, 2006; CHAN; WONG, 1978; KING; ENDERS, 1970).

Estruturalmente o saco vitelino do *N. lasiurus* não diferiu das descrições disponíveis na literatura para outras espécies de roedores murídeos e cricetídeos

com relação à estrutura dos vilos formada por células endodérmicas apoiadas sobre um eixo de mesenquima vascularizado e finalmente uma fina camada mesotelial (SANSOM, 1922; JOLLIE, 1990; KING; ENDERS, 1993; MESS, 2003).

O processo de inversão do saco vitelino é caracterizado pela exposição direta do endoderma do saco vitelino ao lúmen uterino e endométrio uterino. Nas amostras de início de gestação, onde os botões gestacionais foram emblocados inteiros em parafina, pudemos evidenciar em detalhe a relação existente entre o saco vitelino invertido, a placenta e o útero. Para que ocorra essa íntima relação entre a placenta vitelina invertida e a parede uterina conforme demonstrado em nossos resultados, é necessário que haja uma tolerância específica pelas células estromais do endométrio durante o processo de decidualização (ENDERS, 2010) o que ainda hoje resulta em um paradigma do ponto de vista imunológico (KANASHIRO, 2011).

Duas regiões do saco vitelino visceral distintas morfologicamente foram identificadas em placentas de início de gestação, de acordo com a região em que as mesmas se encontravam na placenta. A primeira delas, já bem conhecida e descrita, localizava-se próximo à placenta principal. Nessa região o saco vitelino visceral era formado por vilos, os quais estavam voltados para a face placentária e eram ricamente vascularizados. O endoderma formava a camada mais externa e era composto por células de formato hexagonal repletas de vacúolos e vesículas elétricas densas, além de responder positivamente para o PAS. Essas características mantinham-se ao longo da gestação e ocorrem em outras espécies próximas (SANSOM, 1922; JOLLIE, 1990; FAVARON et al., 2011). No entanto, a segunda região que identificamos, localizada oposta à anteriormente citada, ou seja, distante da placenta principal, porém próxima à parede uterina não apresentava vilos e estava em íntima associação com a parede uterina, a qual se modificava e formava invaginações epiteliais para promover uma melhor aposição do saco vitelino (FAVARON et al., 2012). Não encontramos referência sobre essa região e suas características na literatura, muito provavelmente pela dificuldade em se obter amostras de placenta em estágios muito iniciais de desenvolvimento, o que reforça ainda mais a importância do nosso trabalho. Além disso, nossos dados sugerem que uma nutrição histiotrófica via áreas não vilosas do saco vitelino pode ocorrer em estágios iniciais da gestação.

Com o avanço da gestação, essa íntima associação desaparece. Em outras espécies próximas já descritas (SANSOM, 1922; CARPENTER, 1972; JOLLIE, 1990;

KING; ENDERS, 1993; BENIRSCHKE, 2005; FAVARON et al., 2011) o saco vitelino parece manter um contato de menor intensidade, no entanto, seria importante avaliar amostras de estágios iniciais de desenvolvimento, antes do estabelecimento da placenta corioalantóidea.

No hamster dourado (*Mesocritus auratus*), outra espécie de cricetideo, o saco vitelino recobre o epitélio uterino (CARPENTER, 1972, 1975), entretanto, não foram descritas associações íntimas entre essas membranas, nem no que diz respeito às estruturas glândulares, como as descritas em nossas amostras. O mesmo parece ocorrer no *Phodopus sungorus* (BENIRSCHKE, 2005).

Foi mencionado por King e Enders (1970) que a passagem de nutrientes do organismo materno para o feto é mediada pela placenta, representando um veículo de trocas (GRAY et al., 2001), e desde muito tempo atrás, essa propriedade vem sendo investigada, tendo ainda muitos fatores a serem esclarecidos. A reação positiva pela aplicação da técnica de imunocitoquímica com ácido periódico de Shiff (PAS) nas células endodérmicas do saco vitelino mostrou que essas células funcionam como depósito de glicoproteínas, as quais podem ser liberadas diretamente para o embrião ou feto durante o seu desenvolvimento.

Por conta dessas características nos roedores a placenta vitelina é considerada a placenta funcional antes do desenvolvimento da placenta corioalantóidea (KING, 1971). Identificados na placenta vitelina as regiões de mesotélio, mesenquima e células endodérmicas. Através da marcação por imunohistoquímica para detecção da vimentina, inúmeros vasos sanguíneos fetais foram evidenciados, bem como as ilhotas vasculares do saco vitelino responsáveis pelo processo de hematopoiese. Recentemente foi demonstrado por Vijayaraj et al. (2010) que os processos de hematopoiese e vasculogênese no saco vitelino é regulado por queratinas através da redução da sinalização da BMP-4. Essas queratinas formam o filamento intermediário do citoesqueleto celular.

Recentemente foi descrito a presença de microdomínios de membrana especializados, denominados de cavéolas, no endotélio, células de músculo liso bem como células mesoteliais do saco vitelino de murídeos (MOHANTY et al., 2010). As cavéolas e caveolinas tem sido associadas a várias atividades celulares, incluindo: endocitose (CHENG et al., 2006), vias de sinalização (ECHARRI et al., 2007), regulação de lipídeos (PILCH et al., 2007) e também atividades de mecanosensores (THOMAS; SMART, 2008). Através de análises ultra-estruturais

também localizamos estas estruturas na membrana plasmática do mesotélio do saco vitelino de *N. lasiurus*. Assim como relatado por Mohanty et al., (2010) para roedores murídeos, no *N. lasiurus* as cavéolas possuíam tamanho médio de 80 nm de diâmetro e possuíam delgadas regiões de diafragma. Além disso, evidenciamos a presença de grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso nas proximidades das cavéolas. Nas outras regiões do saco vitelino não identificamos tais estruturas, assim como também foi relatado para o saco vitelino de roedores murídeos (MOHANTY et al., 2010).

As cavéolas formam uma via de endocitose independente de clatrina para captação de moléculas (COOPER; HAUSMAN, 2007). São conhecidos três tipos de caveolinas: caveolina-1, caveolina-2 e caveolina-3 (THOMAS; SMART, 2008), as quais são proteínas periféricas de membrana com peso molecular variando de 18-22 kDa (PATEL et al., 2008) responsáveis por estabilizar as cavéolas através de interações com o citoesqueleto celular. Segundo a literatura (MOHANTY et al., 2010) quanto à morfologia e localização acreditamos que o subtipo presente no mesotélio do saco vitelino de *N. lasiurus* seja a caveolina-1. No entanto, para confirmar seria necessário empregar técnicas de imunomarcção. Embora as cavéolas desempenham importantes funções como mencionamos anteriormente, a ausência dessas estruturas nas outras camadas do saco vitelino, como o endoderma, que devido ao processo de inversão do saco vitelino nos roedores é a camada que fica em contato direto com a parede uterina, pode ser justificado pelo fato que hoje sabe-se que um grande número de microorganismos patogênicos, incluindo vírus e bactérias bem como certas toxinas entram dentro das células através das cavéolas e de microdomínios de membrana semelhantes à cavéolas (NORKIN, 2001; PELKMAN, 2005; MOHANTY et al., 2010). Com isso, a ausência de cavéolas no endoderma do saco vitelino dos roedores pode servir como um mecanismo de proteção para evitar a internalização desses tipos de patógenos e toxinas. Somado a isso, a camada mesotelial do saco vitelino onde identificamos as cavéolas está voltada para a membrana amniótica, que é a mais interna das membranas fetais e, portanto, está mais distante e protegida de qualquer tipo de contaminação, relacionando-se apenas com o embrião/feto em desenvolvimento.

6.2 POTENCIAL DO SACO VITELINO COMO FONTE PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

Evolutivamente, o saco vitelino é a única membrana embrionária e fetal que está presente em todos os vertebrados (MOSSMAN, 1987). Como já mencionado anteriormente, diferentemente das outras membranas (âmnio, alantóide e córion) o saco vitelino desempenha inúmeras e importantes funções durante a embriogênese e placentação, principalmente relacionadas ao transporte de nutrientes, contribuição para o desenvolvimento do embrião e hematopoiese. Por essa razão, o saco vitelino representa uma fonte promissora de células-tronco.

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura explora o saco vitelino como fonte de células-tronco hematopoiéticas (GLOBERSON et al., 1987; LIU; AUERBACH, 1991; HUANG; AUERBACH, 1993; HUYHN et al., 1995; AUERBACH et al., 1996). O que é justificado pela importância dessa membrana para o processo de hematopoiese propriamente dito. O início da hematopoiese surge nas ilhotas vasculares do saco vitelino (AUERBACH et al., 1996), as quais caracterizamos no capítulo dos nossos resultados referente à *Placenta vitelina visceral e parietal*. Como demonstrado, estruturalmente as ilhotas vasculares são constituídas externamente por uma parede de células endodérmicas, que se apóiam em uma camada interna de mesenquima, seguida finalmente por uma fina e delgada camada de mesotélio. É justamente nessa camada de mesenquima do saco vitelino que se desenvolvem os primeiros vasos sanguíneos e ilhotas vasculares, nas quais são encontradas em seu interior as células-tronco hematopoiéticas. De acordo com Auerbach et al. (1996) acredita-se que as ilhas vasculares tenham origem a partir dos hemangioblastos, os quais originam as células endoteliais e o sangue primitivo, sendo portanto o saco vitelino o primeiro local de produção de células sanguíneas durante a ontogenia (PALIS; YODER, 2001). Há evidências de que as células que compõem o saco vitelino dos mamíferos possuem a capacidade de se diferenciar não somente em eritrócitos nucleados embrionários primitivos, mas também em eritrócitos maduros, linfócitos, células mielóides e células que compõem a linhagem celular sanguínea definitiva (AUERBACH et al. 1996; JAFREDO et al. 2005). Desta forma verificamos que existe um grande interesse na obtenção de células-tronco a partir do saco vitelino a fim de isolar células progenitoras capazes de manter a linhagem hematopoiética *in vitro*.

Estes precursores hematopoiéticos derivados do saco vitelino são responsáveis por colonizar mais tarde os tecidos fetais, como fígado, timo, baço, região ventral da aorta, saco vitelino e medula óssea (MOORE; METCALF, 1970), onde posteriormente podem ser identificados nichos hematopoiéticos em potencial como mencionam os trabalhos de Zanjani et al. (1993) e Tavian et al. (1999). No entanto, devemos lembrar que o uso de embriões/fetos e tecidos fetais, principalmente em humanos, ainda possuem certas limitações e restrições, e muitas das fontes de células-tronco como é o caso da medula óssea, apresentam restrições relacionadas ao acesso para a obtenção dessas células, valorizando ainda mais a placenta, o cordão umbilical e as membranas extra-embriônicas como fontes importantes e eticamente aceitáveis para a obtenção de células-tronco.

Além disso, diferente de outras espécies animais, os roedores mantêm o saco vitelino presente até o final da gestação (MOSSMAN, 1987), essa característica dentre muitas outras relacionadas à sua biologia, os tornam um grupo em potencial e interessante do ponto de vista científico para o estudo do saco vitelino como uma fonte alternativa de células-tronco.

Embora bem menos estudadas que as células-tronco hematopoiéticas obtidas através do saco vitelino, o mesmo é uma fonte promissora de células-tronco mesenquimais, como mostram os trabalhos de Van Den Heuven et al. (1987), Wang et al. (2008), Wenceslau et al. (2011), Pessolato (2011) e Francioli (2012).

De acordo com o trabalho de Zuck et al. (2001) quando cultivadas, as células mesenquimais apresentam morfologia semelhante à fibroblastos e são morfológica e fenotipicamente similares entre si. Em nosso cultivo de fragmentos de saco vitelino, identificamos essas mesmas características fibroblastóides nas células progenitoras oriundas do saco vitelino, onde as células possuíam formato fusiforme, às vezes com alguns prolongamentos citoplasmáticos. No entanto, uma segunda população de células com características de células epiteliais foi isolada a partir de fragmentos do saco vitelino de *Necromys lasiurus*. Devemos nos lembrar que como mostramos em nossos resultados o saco vitelino é uma estrutura trilaminar, formada por uma camada de células endodérmicas, mesenquima e células mesoteliais basais, o que justificaria uma cultura heterogênea, as quais podem apresentar necessidades diferenciadas inclusive em relação às condições de cultivo para sua manutenção e melhor desempenho em cultivo. As duas populações identificadas neste trabalho quando analisadas sob citometria de fluxo, apresentaram tamanho e granulosidade

diferentes entre si, sendo que uma população menor (6,5%) era composta por células maiores e de grande granulosidade e outra população, mais abundante (92,13%) era formada por células pequenas e de pouca granulosidade, provavelmente as células semelhantes à fibroblastos. Parece haver um consenso na literatura quanto a maior abundância de células aderentes com morfologia fibroblastóide oriundas de cultura de saco vitelino de diferentes espécies, como em camundongos (VAN DEN HEUVEL et al., 1987), no homem (WANG et al., 2008), no cão (WENCESLAU et al., 2011), em ovinos (PESSOLATO, 2011) e em eqüinos (FRANCIOLLI, 2012).

Quanto ao uso de diferentes meios de cultivo para determinar qual seria o mais eficiente para o cultivo das células mesenquimais, foram testados os meios DMEM-High Glicose e DMEM-F12, suplementados com soro fetal bovino definido ou caracterizado. O uso desses dois tipos de meios de cultivo mostrou-se viável para o cultivo dessas células, porém melhores resultados relacionados à adesão celular, crescimento, manutenção da morfologia indiferenciada ao longo das passagens foi obtido com o meio DMEM-High Glicose. Esse meio de cultivo também foi um dos mais promissores para o cultivo de células progenitoras do saco vitelino de cães (WENCESLAU et al., 2011) propiciando o crescimento de células com morfologia semelhante a fibroblastos e uma melhor taxa de expansão *in vitro*. Segundo os mesmos autores o uso de meio ALPHA-MEM foi mais propício ao crescimento de células semelhantes à células epiteliais.

Wang et al. (2008) isolaram do saco vitelino humano células fibroblastóides morfológicamente homogêneas por várias passagens utilizando meio de cultivo suplementado com fator de crescimento fibroblastóide (FGF). Uma das principais funções dos fatores de crescimento é o controle externo do ciclo celular, abandono da quiescência celular (Fase G0 do ciclo celular) e entrada da célula na Fase G1, o que contribui fortemente para a manutenção das células mesenquimais do saco vitelino com morfologia homogênea por várias passagens, como observado por Wang et al. (2008).

Em nossas culturas, o que realmente interferiu no crescimento das células vitelinas foi à adição do soro fetal bovino definido ou caracterizado. Quando testamos o soro fetal bovino caracterizado às células mudaram sua morfologia e rapidamente (2-3 dias) morreram. Com uso do soro fetal bovino definido as células

criaram, formaram colônias e mantiveram-se indiferenciadas ao longo das passagens.

Em geral as células-tronco mesenquimais são definidas a partir de um conjunto de características apresentadas *in vitro*, incluindo a combinação de marcadores fenotípicos e propriedades funcionais de diferenciação.

A fim de caracterizar fenotipicamente as células-tronco oriundas do saco vitelino de *N. lasiurus* realizamos técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo utilizando marcadores específicos para células mesenquimais e hematopoiéticas.

A fim de avaliar a integridade das células-tronco do saco vitelino do *N. lasiurus* quanto à sua arquitetura, bem como comprovar sua origem mesenquimal, foram utilizados os marcadores de citoesqueleto celular e células-tronco mesenquimal, vimentina, β -tubulina, citoqueratina 18 e Stro-1. Segundo Cooper e Hausman (2007) o citoesqueleto celular corresponde a uma rede de filamentos protéicos que se estende por todo o citoplasma, caracterizando a estrutura da célula, seu formato e organização citoplasmática. Além disso, trabalhos recentes tem mostrado o papel fundamental que essas proteínas exercem sobre os movimentos da célula, pelo transporte intracelular e posicionamento das organelas, como discutido por Ivaska (2007) quanto as funções cruciais da vimentina na adesão, migração e sinalização celular. Notamos a expressão de anticorpos específicos para filamento intermediário (vimentina e citoqueratina 18) e também microtúbulos (β -tubulina) que correspondem a tipos de fibras citosólicas do citoesqueleto. Achados semelhantes para vimentina e citoqueratina foram demonstrados nas células aderentes do saco vitelino de cavalo (FRANCIOLLI, 2012) e cão (WENCESLAU et al., 2011), sendo que nas células caninas não houve a expressão da citoqueratina 18.

Ao analisarmos o marcador de superfície celular Stro-1, o qual é considerado o melhor marcador para células-tronco mesenquimais, embora não seja exclusivo para esse celular, visto que sua expressão não é mantida durante sucessivas passagens (KOLF et al., 2007), notamos sua expressão positiva nas células do saco vitelino do *N. lasiurus*, assim como também observado para células aderentes de saco vitelino de cavalo (FRANCIOLLI, 2012).

Segundo o Comitê de Células-tronco mesenquimal da Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMICINI et al., 2006) as células-tronco mesenquimais humanas são definidas como CD105, CD73 e CD90 positivas e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a, CD19 e HLA. Ao realizarmos a

imunocitoquímica e citometria de fluxo para a maioria desses marcadores, encontramos resultados condizentes ao proposto por Domicini et al. (2006), uma vez que as células do saco vitelino do *N. lasiurus* foram positivas para CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45 e CD34. Quando testado o anticorpo CD48, o qual identifica células comprometidas com linhagens hematopoiéticas (BOLES et al., 2011) o mesmo apresentou variação quanto a sua expressão pelas técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo, tendo 34,8% da população celular sob essa última técnica apresentado expressão positiva. Essa variação pode ser justificada pelo fato da citometria de fluxo ser uma técnica muito mais sensível para esse tipo de marcação. As células aderentes do saco vitelino também foram positivas para CD117 (marcador de células precursoras de células hematopoiéticas). No entanto, não houve expressão dos anticorpos CD34 e CD45, específicos para células-tronco hematopoiéticas.

Ao confrontarmos os achados relacionados à diferentes marcadores de células hematopoiéticas e ou precursores de células hematopoiéticas nas células aderentes oriundas do saco vitelino de diferentes espécies (DOMICINI et al., 2006; KOLF et al., 2007; WANG, 2008; PESSOLATO, 2011; WENCESLAU et al., 2011; FRANCIOLLI, 2012), notamos grandes variações na expressão, ou não expressão, desses marcadores em culturas de saco vitelino. Além disso, demonstramos a reação positiva para o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) em nossas amostras. O que nos faz sugerir que o saco vitelino possui não apenas células mesenquimais bem definidas, mas também células aderentes que possuem um comprometimento com linhagens hematopoiéticas, não havendo necessariamente células hematopoiéticas propriamente ditas na cultura, por conta de uma maior incidência da não expressão de marcadores de células-tronco hematopoiéticas como CD34 e CD45.

A expressão de marcadores de pluripotência (Oct-4 e Nanog) parece ser mais homogênea entre as espécies estudadas, bem como a expressão de marcadores de proliferação celular em culturas de células-tronco de saco vitelino de diferentes espécies (WANG, 2008; WENCESLAU et al., 2011; FRANCIOLLI, 2012). A expressão do fator de transcrição de ambos os marcadores (Oct-4 e Nanog) ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento e está relacionado à manutenção de pluripotência e auto-renovação das células-tronco (CARLIN et al., 2006). A expressão desses marcadores nas células-tronco do saco vitelino pode ser

explicada pela origem precoce dessa membrana durante a embriogênese. Além disso, devemos lembrar que o saco vitelino é o local temporário de localização das células germinativas primordiais. Quando o embrião se diferencia nas camadas germinativas somáticas (ectoderme, mesoderme e endoderme) durante o processo de gastrulação, a maioria das células perdem a sua pluripotência. No entanto, as células germinativas migram e se alojam no saco vitelino e parte do alantóide. Supõe-se que essas células são levadas para fora do corpo do embrião para serem resgatadas dos sinais de diferenciação durante a gastrulação dentro do corpo do embrião, mantendo assim sua pluripotência (HYTTEL et al., 2010).

Quando submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, através do uso de meios de cultura específicos enriquecidos com agentes indutores durante um determinado período de tempo (PITTENGER et al., 1999), as células-tronco do saco vitelino mostraram a capacidade de se diferenciar nas três linhagens mesenquimais. A mesma habilidade foi observada para as diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica nas células progenitoras do saco vitelino humano e eqüino (WANG et al., 2008; FRANCIOLLI, 2011, respectivamente). Além disso, o saco vitelino canino (WENCESLAU et al., 2011) não apresentou habilidade em se diferenciar na linhagem adipogênica. Embora tenhamos conseguido obter as diferenciações nas três linhagens, é sabido que as células-tronco mesenquimais são mais predispostas a produzirem nódulos ósseos ricos em proteoglicanas do que os vacúolos lipídicos da via osteogênica ou os glicosaminoglicanas da via condrogênica (JAVAZON et al., 2004; DAZZI et al., 2006).

Quando verifica-se o tempo necessário para obter os resultados referentes aos ensaios de diferenciação, nota-se que o período necessário para a diferenciação esta diretamente relacionado à origem das células utilizadas no experimento. De maneira que as células mesenquimais de tecidos adultos, diferenciam-se mais rápido, em média 14 dias, justamente por já estarem comprometidas à determinadas linhagens celulares (CSAKI et al., 2007). Enquanto que as células embrionárias e fetais (WENCESLAU et al., 2011) levam um período de tempo maior devido a sua imaturidade, assim como observamos para as células-tronco do saco vitelino de *N. lasiurus*, aproximadamente 21 dias.

Após realizar os ensaios de diferenciação e seguindo os pré-requisitos quanto a utilização das células-tronco na terapia celular, analisamos o potencial tumorigênico das células-tronco do saco vitelino de *N. lasiurus*. Durante o período de

60 dias nenhuma formação tumoral foi observada macroscopicamente e nem nas análises histopatológicas. Baseando-se em outros testes realizados de mesma natureza (FRANCIOLLI, 2011; WENCESLAU et al., 2011) nota-se que as células-tronco vitelinas parecem não exibir capacidade de proliferação e formação tumoral, o que vem a somar para uma futura utilização dessas células dentro da medicina regenerativa, seja ela humana ou veterinária.

Os trabalhos desenvolvidos com células-tronco, independente da origem de cada uma, tem como objetivo comum a sua futura aplicação na terapia celular. Através dos resultados obtidos nessa pesquisa, verificamos que o saco vitelino apresenta não somente células-tronco hematopoiéticas, como já bem se conhece, mas também há a possibilidade de se obter células mesenquimais através dessa tão importante membrana para o desenvolvimento embrionário/fetal. Células essas que mostraram características satisfatórias de crescimento, expansão, congelamento e potencial de diferenciação *in vitro* que as tornam boas candidatas à um futuro teste na terapia celular, além de que quando injetadas em camundongos imunossuprimidos não apresentaram potencial tumorigênico. As células-tronco aderentes obtidas através do saco vitelino expressam principalmente marcadores de natureza mesenquimal. No entanto, não se pode esquecer o papel fundamental que o saco vitelino desempenha para a hematopoiese durante a embriogênese, o qual é claramente caracterizado pela expressão de marcadores de células precursoras de células hematopoiéticas. Neste contexto, o saco vitelino torna-se uma fonte promissora de células-tronco por possuir não apenas nichos de células hematopoiéticas, mas também de células-tronco mesenquimais, que nos roedores em especial mantém-se presente até o final da gestação. Além disso, outra vantagem que as células-tronco do saco vitelino apresentam é a não expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), podendo com isso escapar da rejeição imunológica e serem utilizadas como uma população de células doadoras para receptores allogênicos e xenogênicos (ESKOLA, 1977). Embora aspectos relacionados à uma completa avaliação da plasticidade dessas células, determinando-se o dia exato de gestação durante a coleta, uma vez que as funções desempenhadas pelo saco vitelino variam ao longo dos estágios gestacionais e muito provavelmente estes estágios interfiram nos padrões de expressão dos marcadores; um eficiente direcionamento dessas células a uma linhagem celular específica e funcional que aumente a segurança global de seu uso necessitam ser

estudados e compreendidos em passos futuros, o uso das células-tronco mesenquimais obtidas do saco vitelino desponta como uma ferramenta terapêutica promissora para estudos de terapia celular *in vivo* e restabelecimento de funções de tecidos e órgãos comprometidas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- 1- *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) possui uma placenta zonaria discoidal, corioalantóidea, com três zonas distintas: labirinto, zona juncional e decidua, além de um saco vitelino invertido presente até o final da gestação;
- 2- Foram identificadas também a placenta vitelina visceral e a parietal. A placenta vitelina visceral variou sua morfologia de acordo com a região em que a mesma se encontrava (próxima à parede uterina ou próximo à placenta corioalantóidea), apresentando cavéolas na membrana das células mesoteliais;
- 3- A relação entre as circulações sanguíneas materna e fetal na região do labirinto, que caracteriza a barreira-placentária foi classificada como do subtipo hemotricorial, com espessura média de distância entre a camada trofoblástica I até o endotélio do capilar do feto de 2,41 μm ;
- 4- Células trofoblásticas gigantes foram encontradas em duas regiões distintas da placenta: agrupamentos nas margens laterais do disco placentário e na forma de uma faixa contínua entre a zona juncional e a decídua. Na decidua foram também identificadas células natural killer;
- 5- O saco vitelino mostrou-se como uma fonte viável para a obtenção de células-tronco mesenquimais, as quais apresentaram melhores características quanto ao cultivo e expansão quando cultivadas em meio DMEM-High Glicose, suplementado com soro fetal bovino definido;

- 6- Dois tipos celulares distintos: células semelhantes à fibroblastos e células com características epiteliais foram obtidos na cultura de saco vitelino, com predomínio de células fibroblastóides (92,13%);
- 7- As células-tronco do saco vitelino expressaram principalmente marcadores de células-tronco mesenquimais, no entanto, houve também a expressão para células precursoras de células-hematopoiéticas;
- 8- Quando submetidas ao ensaio de diferenciação, as células-tronco vitelinas tiveram a habilidade de se diferenciar nas três linhagens mesenquimais: osteogênica, adipogênica e condrogênica. E quando injetadas em camundongo imunossuprimidos não desenvolveram formação tumoral.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMOLI, V. C.; CETICA, P. D.; MERANI, M. S.; SOLARI, A. J. Comparative morphologic placental types in Dasypodidae (*Chaetophractus villosus*, *Cabassous chacoensis*, *Tolypeutes matacus* and *Dasypus hybridus*). **Biocell**, v. 25, p. 17-22, 2001.
- ADAMSON, S. L.; LU, Y.; WHITELEY, K. J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M.; PFARRER, C.; CROSS, J. C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulations in the mouse placenta. **Developmental Biology**, v. 250, p. 358-373, 2002.
- ALLEN, L. J.; MCCORMACK, R. K.; JONSSON, C. B. Mathematical models for hantavirus infection in rodents. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 68, p. 511-524, 2006.
- AMBROSO, J.; HARRIS, C. Assessment of histiotrophic nutrition using fluorescence probes. **Methods in Molecular Biology**, v. 889, p. 407-423, 2012.
- ANSELL, J. D.; BARLOW, P. W.; McLAREN, A. Binucleate and polyploidy cell in the decidua of the mouse. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 31, n. 1, p. 223-227, 1974.
- ARMEN, B.; PASCALE, J. M.; BAYARD, V.; MUNOZ, C.; MOSCA, I.; GUERRERO, G.; ARMEN, A.; QUIROZ, E.; CASTILLO, Z.; ZALDIVAR, Y.; GRACIA, F.; HJELLE, B.; KOSTER, F. High seroprevalence of hantavirus infection on the Azuero Peninsula of Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.70, p. 682-687, 2004.
- AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**, v. 14, p. 269-280, 1996.
- AUERBACH, R.; WANG, S. J.; YU, D.; GILLIGAN, B.; LU, L.S. Role of endothelium in the control of mouse yolk sac stem cells differentiation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, n. 3, p. 333-338, 1998.
- BADWAIK, N. K.; RASWEILLER, J. J. Pregnancy. In: _ _ _ _ . **Reproductive Biology of bats**. London: Chrichton, 2000.
- BARON, M. H.; ISERM, J.; FRASER, S. T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. **Blood**, v. 119, p. 4828-4837, 2012.
- BENIRSCHKE, K. Nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*. **Comparative placentation**. Disponível em: <<http://medicine.ucsd.edu/cpa>, 2005>. Acesso em: 21 de junho de 2012.

BEVILACQUA, E. M. A. F.; ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **Journal of Morphology**, v. 198, p. 341-351, 1988.

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.

BOLES, N. C.; LIN, K. K.; LUKOV, G. L.; BOWMAN, T. V.; BALDRIDGE, M. T.; GOODELL, M. A. CD48 on hematopoietic progenitors regulates stem cells and suppresses tumor formation. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 80-87, 2011.

BONATELLI, M.; CARTER, A. M.; FERNANDES MACHADO, M. R.; DE OLIVEIRA, M. F.; DE LIMA, M. C.; MIGLINO, M. A. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.9, 2005.

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

BOUILLOT, S.; RAMPON, C.; TILLET, E.; HUBER, P. Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. **Placenta**, v. 27, p. 882-888, 2006.

BRAMBELL, F. W. R. The passive immunity of the young mammal. **Biological Reviews**, v. 33, p. 488-531, 1958.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle de Roedores. Brasília: Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde, 2002. 132p.

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

BRUIJN, M. F.; SPECK, N. A.; PEETERS, M. C.; DZIERZAK, E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. **Embo Journal**, v. 19, p. 2465–2474, 2000.

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 Zootecias**, v. 6, n. 2, p. 147-167, 2004.

CANTONI, G.; PADULA, P.; CALDERÓN, G.; MILLS, J.; HERRERO, E.; SANDOVAL, P.; MARTINEZ, V.; PINI, N.; LARRIEU, E. Seasonal variation in prevalence of antibody to hantaviruses in rodents from southern Argentina. **Tropical Medicine and International Health**. v. 6, p. 811-816, 2001.

CALUWAERTS, S.; VERCRUYSSSE, L.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. **Placenta**, v. 26, p. 574-584, 2005.

CARLIN, R.; DAVIS, D.; WEISS, M.; SCHULTZ, B.; TROYER, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4:8, 2006.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

CARPENTER, S. J. Light and electron microscopic observations on the morphogenesis of the chorioallantoic placenta of the golden hamster (*Cricetus auratus*). Days Seven through Nine of Gestation. **American Journal of Anatomy**, v. 135, p. 445-476, 1972.

CARPENTER, S. J. Ultrastructural observations on the maturation of the placental labyrinth of the golden hamster (Days 10 to 16 of gestation). **American Journal of Anatomy**, v. 143, p. 315-348, 1975.

CARTER, A. M. Evolution of the placenta and fetal membranes seen in the light of molecular phylogenetics. **Placenta**, v. 22, n. 10, p. 800-807, 2001.

CARTER, A. M. Animal models of human placentation – A Review. **Placenta**, v. 28, p. 129-132, 2007.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 46, 2004.

CHAN, S. T. H.; WONG, P. Y. D. Evidence of active sodium transport in the visceral yolk sac of the rat in vitro. **Physiology**, v. 279, p. 385-394, 1978.

CHENG, Z. J.; SINGH, R. D.; MARKS, D. L.; PAGONO, R. W. Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids (review). **Molecular Membrane Biology**, v. 23, p. 101-110, 2006.

CHIORATTO, G. T. S.; COSTA, E. C. V.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A. M. P. Soroprevalência da infecção por Hantavirus em roedores do Estado do Ceará, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 1-6, 2010.

CHOI, K. The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. **Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research**, v. 11, p. 91-101, 2002.

COAN, P. M.; ANGIOLINI, E.; SANDOVICI, I.; BURTON, G. J.; CONSTÂNCIA, M.; FOWDEN, A. L. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in the mice. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 4567-4576, 2008.

COAN, P. M.; CONROY, N.; BURTON, G. J.; FERGUSON-SMITH, A. C. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. **Developmental Dynamics**, n. 235, p. 3280-3294, 2006.

COAN, P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. **Biology of Reproduction**, v. 70, p.1806-1813, 2004.

COAN, P. M.; VAUGHAN, O. R.; SEKITA, Y.; FINN, S. L.; BURTON, G. J.; CONSTANCIA, M.; FOWDEN, A. L. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. **Journal of Physiology**, v. 588, p. 527-538, 2010.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A célula: uma abordagem molecular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736 p.

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

CROY, B. A.; DI SANTO, J. P.; GREENWOOD, J. D.; CHANTAKRU, S.; ASHKAR, A. A. Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy-a review. **Placenta**, v. 21, S77-S80, 2000. Suplemento A.

CSAKI, C.; MATIS, U. A.; MOBASHERI, H. Y. E.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemical Cell Biology**, v. 128, p. 507-520, 2007.

DAZZI, F.; RAMASAMY, R.; GLENNIE, S.; JONES, S. P.; ROBERTS, I. The role of mesenchymal stem cells in hematopoiesis. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 161-171, 2006.

DEANE, H. W.; RUBIN, B. L.; DRIKS, E. C.; LOBEL, B. L.; LEIPSNER, G. Trophoblastic giant cells in placentas of rats and mice and their probable role in steroid-hormone production. **Endocrinology**, v. 70, n. 3, p. 407- 419, 1962.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 191 p.

DOMICINI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, E.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUPRESSOIR, A.; LAVIALLE, C.; HEIDMANN, T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. **Placenta**, v. 33, p. 663-71, 2012.

DUPRESSOIR, A.; VERNOCHE, C.; HARPER, F.; GUÉGAN, J.; DESSEN, P.; PIERRON, G.; HEIDMANN, T. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 15, p. 64-73, 2011.

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.

ECHARRI, A.; MURIEL, O.; DEL POZO, M. A. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 627-637, 2007.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **American Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 29-68, 1965.

ENDERS, A. C. Development and structure of the villous haemochorial placenta of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Anatomy**, v. 94: 34-45, 1960.

ENDERS, A. C. Uterine receptivity to embryo implantation. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54: 65-74, 2010.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. S. Morphological variation in the interhemal areas of chorioallantoic placentae – a Review. **Trophoblast Research**, v.12, n. 1, p. 1-19, 1998.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition – a Review. **Placenta**, v. 27, p. 11-16, 2006. Suplemento A.

ENDERS, A. C.; HENDRICKX, A.G.; SCHLAFKE, S. Implantation in the rhesus monkey: initial penetration endometrium. **American Journal of Anatomy**, v.167, p. 275-298, 1983.

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

ESKOLA, J. Cell transplantation into immunodeficient chicken embryos. Reconstituting capacity of cells from the yolk sac at different stages of development and from the liver, thymus, bursa of Fabricius, spleen and bone marrow of 15-day embryos. **Immunology**, v. 32, n. 4, p. 467-474, 1977.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, p. 11-45, 1973.

FARIA, M.R.; BEVILACQUA, E. Cytological aspects of vascular invasion by the trophoblast of *Calomys callosus* in hepatic tissues. **Journal of Morphology**, v. 226, p.159-171, 1995.

FAVARON, P. O.; CARTER, A. M.; AMBRÓSIO, C. E.; MORINI, A. C.; MESS, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Placentation in Sigmodontinae: a rodent táxon native to South America. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9 (55), 2011.

FAVARON, P.O.; CARTER, A. M.; MESS, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. An unusual feature of yolk sac placentation in *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). **Placenta**, v. 33, p. 578-580, 2012.

FERNANDES, R. A.; COSTOLA-SOUZA, C.; SARMENTO, C. A. P.; GONÇALVES, L.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Placental tissues as sources of stem cells – Review. **Open Journal of Animal Science**, v. 2, n. 3, p.166-173, 2012.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal of Morphology**, v. 221, p.139-152, 1994.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.O.; MORTARA, R.A.; MINEO, J.R. *Calomys callosus* (Rodentia:Cricetidae) trophoblast cells as host cells to toxoplasma gondii in early pregnancy. **Parasitology Research**, v. 85, p. 647-654, 1999.

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

FLAMINI, M. A.; PORTIANSKY, E. L.; FAVARON, P. O.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MESS, A. M.; MIGLINO, M. A.; BARBEITO, C. G. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*): A caviomorph rodent with natural polyovulation. **Placenta**, v. 32, p. 963- 968, 2011.

FONSECA, B. M.; CORREIA-DA-SILVA, G.; TEIXEIRA, N. A. The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. **Reproductive Biology**, v. 12, p. 97-118, 2012.

FRANCIOLLI, A. L. R. **Medicina veterinária regenerativa: multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelino no modelo equino (*Equus caballus*, Linnaeus 1758)**. 2012. 191 f. Tese Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRANCISCO, A. L.; MAGNUSSON, W. E.; SANAIOTTI, T. M. Variation in growth and reproduction of *Bolomys lasiurus* (Rodentia: Muridae) in an Amazonian savanna. **Journal of Tropical Ecology**, v. 11, p. 419-428, 1995.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, p. 649-658, 2004.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GARCIA-PORRERO, J. A.; GODIN, I. E.; DIETERLEN-LIÉVRE F. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. **Anatomy and Embryology**, v. 192, p. 425-435, 1995.

GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta**, v. 23, p. 3-19, 2002.

GLOBERSON, A.; WOODS, V.; ABEL, L.; MORRISSEY, L.; CAIRNS, J. S.; KUKULANSKY, T.; KUBAI, L.; AUERBACH, R. In vitro differentiation of mouse embryonic yolk sac cells. **Differentiation**, v. 36, p. 185-193, 1987.

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

GOODIN, D. G.; PAIGE, R.; OWEN, R. D.; GHIMIRE, K.; KOCH, D. E.; CHU, Y.; JONSSON, C. B. Microhabitat characteristics of *Akodon montensis*, a reservoir for hantavirus, and hantaviral seroprevalence in an Atlantic Forest Site in Eastern Paraguay. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, p. 104-113, 2009.

GRAY, C. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311-1323, 2001.

HARRIS, L. K. Review: trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. **Placenta**, v. 31, p. S93-S98, 2010. Suplemento 1.

HAYNESWORTH, S. E.; BARBER, M. A.; CAPLAN, I. A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone**, v. 13, p. 69-80, 1992.

HEMBERGER, M. Characteristics and significance of trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 29, p. 4-9, 2007. Suplemento 1.

HIGGINS, M.; FELLE, P.; MOONEY, E. E.; BANNIGAN, J.; MCAULIFFE, F. M. Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes. **Placenta**, v. 32, p. 564-569, 2011.

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

HU, D.; CROSS, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 341-354, 2010.

HUANG, H.; AUERBACH, R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 21, p. 10110-10114, 1993.

HUYAN, A.; DOMMERGUES, M.; IZAC, B.; CROISILLE, L.; KATZ, A.; VAINCHENKER, W.; COULOMBEL, L. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. **Blood**, v. 86, p. 4474-, 1995.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. Toronto: Ed. Saunders Elsevier, 2010. 455 p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 4. ed. Zurich, 1994. (Together with Nomina Histological, 2. ed., 1992 and Nomina Embriologica Veterinaria, 1992).

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, p. 2050-2062, 2007.

JAFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D. G.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, p. 269-277, 2005.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 5, p. 414-425, 2004.

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

JUNQUEIRA, L. C. V.; BIGNONAS, G.; BRETAN, R. P. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. **Histochemistry Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 448 p.

KANASHIRO, C. **Análise da dinâmica da origem e destino das células trofoblásticas na interface materno-fetal do útero gestante do cobaio na elucidação da organização da placenta vitelina invertida**. 2011. 116 f. Tese Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KANASHIRO, C.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. M.; CARTER, A. M. Growth and development of the placenta in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 57, 2009.

KAUFMANN, P. Electron microscopy of the guinea-pig placental membranes. **Placenta**, p. 3-10, 1981.

KAUFMANN, P. Guinea pig *Cavia porcellus*. Comparative placentation. Disponível em: <<http://placentation.ucsd.edu/cavia.htm>; 2004>. Acesso em: 21 de junho de 2012.

KIM, J. J.; JAFFE, R. C.; FAZLEABAS, A. T. Blastocyst invasion and the stromal response in primates. **Human Reproduction**, v. 14, p. 45-55, 1999.

KING, B. F. Differentiation of parietal endoderm cells of the “guinea pig” yolk sac, with particular reference to the development of endoplasmic reticulum. **Developmental Biology**, v. 26, p. 547-559, 1971.

KING, B. F.; ENDERS, A. C. The fine structure of the “guinea pig” visceral yolk sac placenta. **American Journal of Anatomy**, v. 127, n. 4, p. 397-414, 1970.

KING, B. F.; HASTINGS, R. A. The comparative fine structure of the interhemal membrane of chorioallantoic placentas from six genera of myomorph rodents. **American Journal of Anatomy**, n. 149, p. 165-180, 1977.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. 204, 2007.

KREHBIEL, R. H. History of the decidual plasmodia or giant cells of *Citellus townsendi*. **Anatomical Record**, v. 50, n. 3, p. 275, 1937.

LABASTIE, M. C.; CORTES, F. P.; Romeo, H.; Dulac, C.; Peault, B. Molecular precursor cells emerging in the human embryo. **Blood**, v. 92, p. 3624–3635, 1998.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, v.19, n.1, p.29-38, 2005.

LALIBERTÉ, F.; MUCCIELLI, A.; LALIBERTÉ, M. F. Dynamics of antibody transfer from mother to fetus through the yolk sac in the rat. **Biology of the Cell**, v. 50, p. 255-61, 1984.

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

LI, J.; LAMARCA, B.; RECKELHOFF, J. F. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, p. H1-H8, 2012.

LIMONGI, J. E.; FERRO, E. A. V. Barreira Placentária de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Bioscience Journal**. v. 19, n. 3, p. 89-94, 2003.

LIU, C. P.; AUERBACH, R. In vitro development of murine T cells from prethymic and prelive embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. **Development**, v. 113, p. 1315-1323, 1991.

LÓPEZ-GARCÍA, C.; LÓPEZ-CONTRERAS, A. J.; CREMADES, A.; CASTELLS, M. T.; MARIN, F.; SCHREIBER, F. Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice. **Endocrinology**, v. 149, p. 5012-5023, 2008.

LUCKETT, W. P. Uses and limitations of mammalian fetal membranes and placenta for phylogenetic reconstruction. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 514-527, 1993.

LUX, C. T.; YODER, M. C. Novel methods for determining hematopoietic stem and progenitor cell emergence in the murine yolk sac. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 1003-1009, 2010.

MALANDRO, M. S.; BEVERIDGE, M. J.; KILBERG, M. S.; NOVAK, D. A. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placenta amino acid transport. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 295-303, 1996.

MALASSINÉ, A.; FRENDON, J. L.; EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 531-539, 2003.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, estereologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994. p.5-7.

MAYHEM, T. M.; BURTON, G. J. Stereology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p.195-205, 1997.

MESS, A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. **Journal of Experimental Zoology**, v. 299, p.78-98, 2003.

MESS, A. The guinea pig placenta – model of placental growth dynamics. **Placenta**, v. 28, p.812-815. 2007.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 30, p. 681-687, 2006.

MOHALLEM, S. V.; LOBO, D. J. A.; PESQUERO, C. R.; ASSUNÇÃO, J. V.; ANDRE, P. A.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHNIKOFF, M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. **Environmental Research**, v. 98, p. 196-202, 2005.

MOHANTY, S.; ANDERSON, C. L.; ROBINSON, J. M. The expression of caveolina-1 and the distribution of caveolae in the murine placenta and yolk sac: parallels to the human placenta. **Placenta**, v. 31, p. 144-150, 2010.

MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **British Journal Haematology**, v. 18, n. 3, p. 279-296, 1970.

MOREIRA, J. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. **Capybara biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. New York: Ed. Springer. 2012.

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

MULLER, A. M.; MEDVINSKY, A.; STROUBOULIS, J.; GROSVELD, F.; DZIERZAK, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo., **Immunity**, v. 1, n. 4, p. 291-301, 1994.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Superfamily Muroidea. In: WILSON, D.E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 894-1531.

NORKIN, L. C. Caveolae in the uptake and targeting of infections agents and secreted toxins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 49, p. 301-315, 2001.

NORTH, T. L.; STACY, T. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. **Development**, v. 126, p. 2563–2575, 1999.

NOWAK, R. **Walker's mammals of the world**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1999. v.2.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocos, *Kerodon rupestris*. Wied, 1820**. 2004. 208 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – 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.

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

OLIVEIRA, M. F.; VALE, A. M.; FAVARON, P. O.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, G. B.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). **Placenta**, v.33, 876-881, 2012.

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

PATEL, H. H.; MURRAY, F.; INSEL, P. A. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 359-391, 2008.

PELKMAN, L. Secrets of caveolae – and lipidic raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 295-304, 2005.

PESSOLATO, A. G. T. **Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)**. 2011. 189 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PEREIRA, H. F. A.; ESTON, M. R. Biologia e manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Parque Estadual Alberto Löfgren, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, v. 19, n. 1, p. 55-64, 2007.

PIJNENBORG R. **Placentation in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse)**. Thesis, Katolieke Universitet Leuven. Leuven: Acco, 1975. p. 1-144.

PIJNENBORG, R.; ROBERTSON, W. B.; BROSENS, I. The arterial migration of trophoblast in the uterus of golden hamster, *Mesocricetus auratus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 269-280, 1974.

PILCH P. F.; SOUTO, R. P.; LIU, L.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; BERG, E. A.; COSTELLO, C. E. Cellular spelunking: exploring adipocytes caveolae. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 2103-2116, 2007.

PITTENGER, M. F.; MACRAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POOR, A. **Sigmodontinae** (on-line), 2005. Animal Diversity Web. University of Michigan Museum of Zoology. Disponível em: HTML://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Sigmodontinae.html. Acesso em: 07 de Agosto de 2009.

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

REIG, O. A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muróides sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, p. 333-365, 1984.

REZENDE, L. C.; BARBEITO, C. G.; FAVARON, P. O.; MESS, A.; MIGLINO, M. A. The fetomaternal interface in the placenta of three species of armadillos (Eutheria,

Xenarthra, Dasypodidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, p. 38 -, 2012.

ROBERTS, C. T.; SOHLSTROM, A.; KIND, K. L.; KARL, R. A.; KHONG, T. Y.; ROBINSON, J. S.; OWENS, P. C.; OWENS, J. A. Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. **Placenta**, v. 22, p. 177-185, 2001.

SALBAUM, J. M.; KRUGER, C.; ZHANG, X.; DELAHAYE, N.; PAVLINKOVA, G.; BURK, D. H.; KAPPEN, C. Altered gene expression and spongiotrophoblast differentiation in placenta from a mouse model of diabetes in pregnancy. **Diabetologia**, v. 54, p. 1909-1920, 2011.

SANSOM, G. S. Early development and placentation in *Arvicola (Microtus) amphibius*, with special reference to the origin of the placental giant cells. **Journal of Anatomy**, v. 56, p. 333-365, 1922.

SENNER, C. E.; HEMBERGER, M. Regulation of early trophoblast differentiation – lessons from the mouse. **Placenta**, v. 31, p. 944-950, 2010.

SIMMONS, D. G.; CROSS, J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Development Biology**, v. 284, p. 12-24, 2007.

SOLOVEVA, V.; LINZER, D. I. H. Differentiation of placental trophoblast giant cells requires downregulation of p53 and Rb. **Placenta**, v. 25, p. 29-36, 2004.

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of the rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n.1, p. 13-24, 1997.

TAVIAN, M.; COULOBEL, C.; LUTON, D.; SAN CLEMENTE, E.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; PEAULT, B. Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. **Blood**, v. 87, p. 67–72, 1996.

TAVIAN, M., HALLAIS M. F., PEAULT, B, Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. **Development**, v. 126, p. 793–803, 1999.

TESSER, R. B.; SCHERHOLZ, P. L. A.; NASCIMENTO, L.; KATZ, S. G. Trophoblast glycogen cells differentiate early in the mouse ectoplacental cone: putative role during placentation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 134, p. 83-92, 2010.

THOMAS, C. M.; SMART, E. J. Caveolae structure and function. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 796-809, 2008.

TISSOT VAN PATOT, M. C.; MURRAY, A. J.; BECKEY, V.; CINDROVA-DAVIES, T.; JOHNS, J.; ZWERDLINGER, L.; JAUNIAUX, E.; BURTON, G. J.; SERKOVA, N. J. Human placental metabolic adaptation to chronic hypoxia, high altitude: hypoxic

preconditioning. **American Journal of Physiology. Regulator, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p.166-172, 2010.

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

TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFTE, M.; DELFORGE, A.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. **Cytotherapy**, v. 6, n. 4, p. 372-379, 2004.

VAN DEN HEUVEL, R. L.; VERSELE, S. R. M.; SCHOETERS, G. E. R.; VANDERBORGHT, O. L. J. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. **British Journal of Haematology**, v. 66, p. 15-20, 1987.

VERAS, M. M.; DAMACENO-RODRIGUES, N. R.; CALDINI, E. G.; RIBEIRO, A. A. C. M.; MAYHEW, T. M.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHNIKOFF, M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 578-584, 2008.

VERCRUYSSE, L.; CALUWAERTS, S.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during last third pregnancy in the rat. **Placenta**, v. 27, p. 22-33, 2006.

VERNOCHET, C.; HEIDMANN, O.; DUPRESSOIR, A.; CORNELIS, G.; DESSEN, P.; CATZEFLIS, F.; HEIDMANN, T. A syncytin-like endogenous retrovirus envelope gene of the guinea pig specifically expressed in the placenta junctional zone and conserved in Caviomorpha. **Placenta**, v. 32, p. 885-92, 2011.

VIJAYARAJ, P.; KROEGER, C.; REUTER, U.; HARTMANN, D.; MAGIN, T. M. Keratins regulate yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis through reduced BMP-4 signaling. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 299-306, 2010.

ZANJANI, E. D.; ASCENSÃO, J. L.; TAVASSOLI, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. **Blood**, v.81, p. 399-404, 1993.

ZHANG, J. H.; CHEN, Z.; SMITH, G. N.; CROY, B. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cellular & Molecular Immunology**, v. 8, p. 1-11, 2011.

ZHANG, J. H.; YAMADA, A. T.; CROY, B. A. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. **Placenta**, v. 30, p. 968-973, 2009.

ZYBINA, T. G.; ZYBINA, E. V. Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. **Cell Biology International**, v. 29, p.1071-1083, 2005.

ZUCK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KAT, A. J.; BENHAİM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

WANG, X. Y.; LAN, Y.; HE, W. Y.; ZHANG, L.; YAO, H. Y.; HOU, C. M.; TONG, Y.; LIU, Y. L.; YANG, G.; LIU, X. D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephrons and yolk sac of human embryos. **Blood**, v. 111, p. 2436-, 2008.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering**, v. 17, p. 2165-2176, 2011. Part A.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Estágio realizado no INRA - *Institut National
de la Recherche Agronomique*, Jouy-en-
Josas, Paris, França

Durante o período de 06 de fevereiro a 06 de abril de 2012 tive a oportunidade de estagiar no Departamento de Biologia do Desenvolvimento e Reprodução, junto à Equipe de Epigenética e Determinantes Precoces da Saúde no Adulto, no Institut National de la Recherche Agronomique-INRA, em Jouy-en-Josas, Paris-França, sob orientação das Professoras: Dra. Pascale Chavatte-Palmer e Dra. Anne Tarrade.

Durante o período do estágio pude desenvolver um trabalho de pesquisa, no qual estudamos através de técnicas de quantificação por estereologia e análises estatísticas as mudanças na dinâmica do desenvolvimento da placenta de *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae) durante os estágios de início (10-13 dias), meio (15-16 dias) e final de gestação (21-22 dias) relacionadas às alterações do volume total da placenta, bem como o volume relativo das regiões de labirinto, zona juncional e decidua. Além disso, devido a importância da região de labirinto para as trocas materno-fetais, atenção especial foi dada aos componentes celulares dessa área da placenta. Para tanto, quantificamos também ao longo dos três estágios gestacionais avaliados, o volume ocupado pelos vasos fetais, espaços sanguíneos materno, trofoblasto e células trofoblásticas gigantes. Afim de comparação, placentas próximo ao final de gestação de camundongo (*Mus musculus*, Rodentia, Muridae) foram também avaliadas sob as mesmas técnicas. Em particular, exploramos o significado funcional relacionado às mudanças quantitativas de cada componente celular durante a gestação e discutimos os aspectos semelhantes e diferentes entre ambos os táxons de roedores (cricetídeos e murídeos).

Os resultados foram compilados gerando um artigo científico que está em fase final de correção pelos autores (apresentado a seguir), para então ser submetido para publicação na revista científica: Reproductive, Biology and Endocrinology.

Quantitative differentiation of the placenta in the New World mouse *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae)

Phelipe Oliveira Favaron^{1§}, Andrea Maria Mess¹, Moacir Franco de Oliveira², Maria Angelica Miglino¹, Pascale Chavatte-Palmer³, Anne Tarrade³

¹Department of Surgery, School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brazil

²Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil

³INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, ENVA, F-94704, Maisons-Alfort, Foundation PremUp, Paris, France

Abstract

Background: Stereology is an established method to extrapolate three-dimensional quantities from two-dimensional images. It was applied to placentation in the mouse, but for other rodents data are absent. We provide the first study on quantitative placental development in a sigmodontine rodent species with relatively similar gestational period, body mass and placental structure than the mouse. We question if both have similar developmental patterns and address functional significances related to quantitative changes. **Methods:** The total and relative volumes of the placenta and its main regions (labyrinth, junctional zone, decidua) and the components of the feto-maternal interface inside the labyrinth (trophoblast, giant cells, blood system) in *N. lasiurus* were estimated by using Mercator® software, statistical analysis (one-way ANOVA, Mann and Whitney test) and Graphpad Prism® in up to 31 placentas of three phases of gestation. **Results:** A significant increase in the total volumes of the placenta and its main areas occurred from early to mid-gestation, followed by a reduction near term. The labyrinth became the relative most prominent area. The relative volumes of the components in the labyrinth differed: fetal vessels and giant cells increased, trophoblast decreased and maternal blood spaces were without significant changes in gestation. **Conclusions:** The quantitative placental development differed between *N. lasiurus* and the mouse. In particular, the low placental efficiency in *N. lasiurus* seemed to force optimizations for fetomaternal exchange. In conclusion, though structural aspects of placentation were relatively similar in these species, the quantitative dynamics showed important differences.

Keywords: Stereology; Sigmodontinae, decidua; junctional zone; labyrinth; haemochorial barrier; trophoblast; vasculature; evolution.

Background

Stereology is a well-established method to extrapolate three-dimensional, structural quantities from measurements on two-dimensional sectional images by using a randomized design-based approach [1,2]. It facilitates interpretations from a whole organ to the subcellular level [3]. Besides other organs, this method has been used to investigate the development of placental tissues with special reference to the feto-maternal relationships in the human placenta [3,4]. Stereology contributed to clarify key issues on normal and abnormal morphogenesis in human placentation [4-8]. Stereological methods also have been applied on placentation in animal species such as the mouse [9], the bovine including cloned specimens [10,11], the horse [12-14] and non-human primates [15,16].

Rodents, the mouse in particular, are regarded as adequate animal models in comparison to human placentation [17-20]. However, studies on quantitative aspects of normal placentation and pathological aspects are rare and refer to the mouse only [9,21-31]. In contrast, available are structural data on placental development in the mouse [18,32-37] and near relatives such as the rat [38]. Investigations in Cricetidae including New World mice or Sigmodontinae [39-44], which are close relatives of Muridae, indicated that structural aspects of placentation represented a largely conserved pattern. The chorioallantoic placenta in both groups is zonary, discoidal and organized into labyrinth, junctional zone, and decidua (Fig. 1A,B) with haemochorial type of the fetomaternal interface inside the labyrinth (Fig. 1C,D). We herein provide the first study on the quantitative development of main placental regions in a sigmodontine rodent of South American savannas, *Necomys lasiurus*. It has a body mass of 60 g and a gestational period of 23 days [45], which is relatively similar to the mouse with about 20 g body mass (variable in different strains!) and 19 to 21 days of pregnancy. Special reference is drawn to the development of volume quantities of placental areas and components of the labyrinth as area of fetomaternal interface. For comparison, near term placentas of the mouse were included. In particular, we wanted to address functional significances related to quantitative changes during gestation and questioned if both taxa have similar patterns of quantitative development.

Methods

Altogether 31 placentas of *N. lasiurus* were studied, obtained from a breeding group at the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. The project was approved by the Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (Protocol number 1766/2009). The material covered three gestational phases, i.e. early gestation (10-13 days, n=14), mid gestation (15-16 days, n=9) and near term (21-22 days, n=8). The age was estimated by using crown-rump lengths (CRL) of embryos and fetuses in comparison to published data on the mouse [46]. Embryos/fetuses and placentas were weighed and placental diameter and volume were noted and the placental efficiency (fetal weight / placental weight) were given (Table 1). For comparison, four near term placentas of the mouse (day 18.5) were investigated by the same methods.

The material was fixed in 10% formalin or 2.5% glutaraldehyde. Placentas were dehydrated by increasing ethanol solutions, cleared in xylene, embedded in paraplast and sectioned at 5 μ m (Leica RM2155 microtome, Germany). In early gestation, fetal erythrocytes are nucleated, thus the fetal and maternal blood systems inside the labyrinth were distinguishable in histological sections stained with haematoxylin and eosin (H&E, see Fig. 1C). Later, fetal erythrocytes lost their nuclei. Immunostaining against vimentin (see below) was used to identify the endothelium of fetal vessels in mid-gestation and near term placentas (Fig. 1D). In contrast, the trophoblast lining the maternal blood spaces was vimentin-negative (Fig. 1D). The immunostaining of vimentin followed the protocol of [47].

The total volumes of the placenta and its compartments (labyrinth, junctional zone, and decidua) as well as the relative volumes (volume fractions) of these areas were estimated by stereology (early gestation, n=3; mid-gestation, n=4; and near term, n=3). Transversely cutted and serially sectioned whole placentas were used. Slices were counted following the Cavalieri protocol [2]. Sections every 60 cuts were selected for analysis. The slides were photographed using a NanoZoomer Digital Pathology System (NDP Scan U10074-01, Hamamatsu, Japan) to produce full panoramic views. To get the total and relative volumes the entire two-dimensional diameter of the areas of interest were marked in all images and the three dimensional values were estimated by using a Mercator® software and statistical analysis (one-way ANOVA, Mann and Whitney test) and shown by using a Graphpad Prism®. Total and relative volumes of important components in the labyrinth as areas of the fetomaternal interface (fetal vessels, giant cells, trophoblast, and maternal blood channels) were quantified by One Stop Stereology in photos from the labyrinth in total of all 31 placentas, stained by either haematoxylin and eosin or vimentin, following the application of the Cavalieri protocol

above. Data were analyzed by using the Mercator® software and statistical analysis (one-way ANOVA, Mann and Whitney test) was performed using Graphpad Prism®.

Results

N. lasiurus had a placental efficiency lower than 1.0 throughout pregnancy (Table 1). Total and relative volume values of the placentas and their main regions throughout gestation were given in Table 2. A significant increase occurred in the absolute placental volume from early ($4.427 \pm 0.282 \text{ mm}^3$) to mid-gestation ($12.98 \pm 1.305 \text{ mm}^3$, $p < 0.01$), followed by a likewise significant reduction of the volume from mid-gestation to near term ($7.52 \pm 0.155 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$). The absolute volumes of labyrinth zone, junctional zone, and decidua followed the same trend (Fig. 2A). The labyrinth became the relatively most prominent area during gestation, whereas especially the relative volume of the decidua was reduced (Fig. 2B). The labyrinth increased its total volume from 2.17 mm^3 in early gestation to 7.03 mm^3 in mid-gestation, followed by a reduction to 4.47 mm^3 near term (Fig. 2B). The total volume of the junctional zone was enlarged from 2.34 mm^3 in early pregnancy to 2.82 mm^3 in mid gestation, followed by a reduction to 1.67 mm^3 near term (Fig. 2A). The total volume of the decidua extended from 1.47 mm^3 in early gestation to 1.65 mm^3 in mid-gestation, followed by the reduction to 1.37 mm^3 near term (Fig. 2A). In near term placentas of the mouse the total volume of the placenta was 21.64 mm^3 . The labyrinth was also the most prominent placental area, although the size of the junctional zone was large too (Fig. 2A,B).

The relative values or volume fractions of the main components in the labyrinth zone differed during gestation (Fig. 3A-D). A continuous increase occurred in the relative volume of fetal vessels (Fig. 3A) from day 10 ($7.38 \pm 0.49\%$) to day 22 ($34.05 \pm 0.876\%$, $p < 0.01$). The volume fraction of giant cells (Fig. 3B) likewise increased from early pregnancy ($6.11 \pm 0.847\%$), mid-gestation ($11.66 \pm 0.286\%$) and near term ($19.26 \pm 1.344\%$, $p < 0.01$). In contrast, the relative volume of the trophoblast (Fig. 3C) was high in early pregnancy ($59.29 \pm 2.215\%$) and mid-gestation ($37.29 \pm 1.013\%$); to term it decreased significantly ($21.16 \pm 0.658\%$, $p < 0.01$). The maternal blood spaces did not undergone significant variation in their relative volumes throughout pregnancy (Fig. 3D). In contrast, in the near term mouse placentas the trophoblast was the relatively most abundant tissue inside the labyrinth ($41.82 \pm 0.748\%$). The relative volumes of fetal vessels, maternal blood spaces and especially giant cells were much lower ($23.66 \pm 0.446\%$, $24.48 \pm 0.855\%$ and 9.95 ± 0.339 , respectively).

Discussion

Improvements in stereology focus on techniques to obtain results close to reality [2]. Coan et al. [9] favored the use of resin embedded tissues to minimize tissue shrinkage. Most papers on mouse placentas followed this method [9,48,49]. We used paraffin embedded tissues that enable immunohistochemistry and a better identification of structural components. Both methods resulted in similar relative volumes in near term mouse placentas. However, weights and absolute volumes differ, indicating that the strains were variable.

In detail, the data on *N. lasiurus* showed a significant increase in the absolute volume of the placenta and the main regions from early to mid-gestation, followed by a decrease to near term. Thus, the maximum of placental extension was reached during mid-gestation. This is similar to what was known for the mouse [9,48,49], supporting the interpretation that general patterns of placental structure and development were largely conserved within the rodent suborder Muroidea. In contrast, the placenta grows continuously in the human, at least under normal conditions, whereas external factors such as multiple pregnancies and diseases could influence this development [5,7,8,50,51]. The differences in growth pattern between the human on the one side and the mouse and its relatives on the other side may have an important influence during gestation. Thus, differential and growth aspects should not be uncritically investigated in an animal model such as the mouse. For instance, Carter[19] provided a balanced and critical discussion on the suitability of the mouse as model species in comparison for human placentation.

However, the absolute volume of the mouse placenta during gestation and near term [9,28,48,49, our results] was about 2 to 3 fold higher than that of *N. lasiurus*, which had a greater body mass. Placental efficiency near term was more than 10 in the mouse [9,49,52], but only 0.9 for *N. lasiurus*. The relative values of the placental regions in *N. lasiurus* indicated that the labyrinth was the most prominent area throughout gestation. In the mouse, the labyrinth also was the most prominent area [9, own results], but its relative size in comparison to the junctional zone was not that different than in *N. lasiurus*. Only in the labyrinth, the fetal capillaries and maternal blood channels are in contact; thus this area has a key role for fetomaternal exchange processes and fetal growth. We can only speculate that the very low placental efficiency in sigmodont rodents limits the relative decrease of the labyrinth during pregnancy. The junctional zone contains giant cells, glycogen cells and spongiotrophoblasts [9,26,44], which may have important endocrine function in early gestation, but which may not be essential to maintain the exponentially growing fetuses towards term.

The relative volumes of the components inside the labyrinth as most important area for fetomaternal exchange differ during gestation in *N. lasiurus*: fetal vessels and giant cells increased, trophoblast decreased and maternal blood spaces were without significant changes. These changes may contribute to meet the demands of the developing fetus for adequate nutrition and probably to compensate the low placental efficiency. The relative increase of fetal vessels seems to be most important in that regard. Moreover, the relative reduction of the trophoblast in advanced pregnancy corresponds to a thinning of the three-layered interhemal barrier that optimizes the diffusion distance between the maternal and fetal blood systems [44]. In the mouse, trophoblast became the relative most abundant tissue, whereas particularly giant cells were reduced [9, own results]. Optimization for exchange seems to be less significant compared to *N. lasiurus*, which may reflect the effective placentation in the mouse. Finally, trophoblastic giant cells maintain important functions for invasion processes in early mouse gestation including the modulation of hormones and growth factor activities [53,54]; their reduction towards term correlate with that function. Further studies are necessary to reveal additional functions that may be realized in the labyrinthine giant cells in sigmodontine rodents and that may explain their relative explosion during advanced pregnancy even though trophoblast in general was reduced.

Conclusion

Though structural aspects of placentation were relatively similar in *N. lasiurus* and the mouse, the quantitative dynamics showed important differences. In particular, the low placental efficiency in *N. lasiurus* seemed to force a more pronounced optimization for fetomaternal exchange processes.

Acknowledgements

For technical support we thank Nicole, Marie-Cristine, Sylvaine, Eve, Michelle and other members of the Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, as well as members of the the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. This research was supported by grants from FAPESP.

Competing interests

There are no financial competing interests for any of the authors.

Authors' contributions

PCP, MAM, and AT devised the study and participated in its design. POF did the practical analysis, advised by AT. MFO and POF sampled the material. AMM and POF wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Gundersen HJ, Jensen EB: **The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.** *Journal of Microscopy* 1987, **147**:229-263.
2. Howard CV, Reed MG: **Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy**, 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific; 2005.
3. Mayhew TM: **Stereology and the Placenta: Where's the Point? – A Review.** *Placenta* 2006, **27**:S17-S25.
4. Mayhem TM, Burton GJ: **Stereology and Its Impact on Our Understanding of Human Placental Functional Morphology.** *Microscopy Research and Technique* 1997, **38**:195-205.
5. Mayhew TM: **Recent applications of the new stereology have thrown fresh light on how the placenta grows and develops its form.** *Journal of Microscopy* 1997, **186**:153-163.
6. Mayhew TM, Jairam IC: **Stereological comparison of 3D spatial relationships involving villi and intervillous pores in human placentas from control and diabetic pregnancies.** *Journal of Anatomy* 2000, **197**:263-274.
7. Mayhew TM: **A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies.** *Journal of Anatomy* 2009, **215**:77-90.
8. Higgins M, Felle P, Mooney EE, Bannigan J, McAuliffe Fm: **Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes.** *Placenta* 2011, **32**:564-569.
9. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ: **Developmental Dynamics of the Definitive Mouse Placenta Assessed by Stereology.** *Biology of Reproduction* 2004, **70**:1806-1813.
10. Kannekens EM, Murray RD, Howard CV, Currie: **A stereological method for estimating the fetomaternal exchange surface area in the bovine placentome at 135 days of gestation.** *Research in Veterinary Science* 2006, **81**:127-133.
11. Ribeiro AACM, Lacerda PMO, Melo MP, Balieiro JCC, Souza RR: **Placental microstructure and efficiency in cloned bovines: a design-based stereological approach.** *Cell Tissue Research* 2008, **333**:105-114.
12. Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rosedale PD, Fowden AL: **Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in horse. I. Development in utero.** *Reproduction* 2002, **123**:445-453.
13. Wilsher S, Allen WR: **The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare.** *Equine Veterinary Journal* 2003, **35**:476-483.
14. Sibbons P: **The role of stereology in the study of placental transfer between fetal foal and mare.** *Equine Veterinary Journal* 2006, **38**:106-107.
15. Rutherford JN, Tardif SD: **Developmental Plasticity of the Microscopic Placental Architecture in Relation to Litter Size Variation in the Common Marmoset Monkey (*Callithrix jacchus*).** *Placenta* 2009, **30**:105-110.
16. Samson JE, Mari G, Dick-Jr EJ, Hubbard GB, Ferry-Jr RJ, Schlabritz-Loutsevitch: **The morphometry of maternal-fetal oxygen exchange barrier in the baboon model.** *Placenta* 2011, **32**:845-851.

17. Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JCP: **Genes, development and evolution of the placenta.** *Placenta* 2003, **24**:123-130.
18. Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D: **A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model.** *Human Reproduction Update* 2003, **9**:531-539.
19. Carter AM: **Animal models of human placentation - a review.** *Placenta* 2007, **28**:S41-S47.
20. Salbaum JM, Kruger C, Zhang X, Arbour Delahaye N, Pavlinkova G, Burk DH, Kappen C: **Altered gene expression and spongiotrophoblast differentiation in placenta from a mouse model of diabetes in pregnancy.** *Diabetologia* 2011, **54**:1909-1920.
21. Shrader RE, Hirsch KS, Levin J, Hurley LS: **Attenuating effect of zinc on abnormal placental morphology in 6-mercaptopurine treated rats.** *Teratology* 1978, **17**:315-325.
22. Malandro MS, Beveridge MJ, Kilberg MS, Novak DA: **Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placenta lamino acid transport.** *American Journal of Physiology* 1996, **271**:295-303.
23. Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL, Karl RA, Khong TY, Robinson JS, Owens PC, Owens JA: **Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig.** *Placenta* 2001, **22**:177-185.
24. Levario-Carrillo M, Olave ME, Corral DC, Alderete JG, Gagiotti SM, Bevilacqua E: **Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion.** *Experimental and Toxicologic Pathology* 2004, **55**:489-496.
25. Mohallem SV, Lobo DJA, Pesquero CR, Assunção JV, Andre PA, Saldiva PHN, Dolhnikoff M: **Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo.** *Environmnetal Research* 2005, **98**:196-202.
26. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC: **Origin and Characteristics of Glycogen Cells in the Developing Murine Placenta.** *Developmental Dynamics* 2006, **235**:3280-3294.
27. Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E, Kutschke WL, Kienzle MF, Leach JE, Sharma JA, Sharma RV, Davisson RL: **Chronic Tempol Prevents Hypertension, Proteinuria, and Poor Feto-Placental Outcomes in BPH/5 Mouse Model of Preeclampsia.** *Hypertension* 2008:1058-1065.
28. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro AACM, Mayhew TM, Saldiva PHN, Dolhnikoff M: **Particulate Urban Air Pollution Affects the Functional Morphology of Mouse Placenta.** *Biology of Reproduction* 2008, **79**:578-584.
29. Coan PM, Vaughan OR, Sekita Y, Finn SL, Burton GJ, Constanica M, Fowden AL: **Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice.** *Journal of Physiology* 2010, **588**:527-538.
30. Li J, LaMarca B, Reckelhoff JF: **A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model.** *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2012, **303**:H1-H8.
31. Rennie MY, Dentmar J, Whiteley KJ, Jurisicova A, Adamson SL, Sled JG: **Expansion of the fetomaternal vasculature in late gestation in strain dependent in mice.** *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2012, **15**:H1261-H1273.
32. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC: **Interations between trophoblast cells and the maternal and fetal circulations in the mouse placenta.** *Developmental Biology* 2002, **250**:358-373.
33. Zhang JH, Yamada AT, Croy BA: **DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua.** *Placenta* 2009, **30**:968-973.

34. Hu D, Cross JC: **Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta.** *International Journal of Developmental Biology* 2010, **54**:341-354.
35. Senner CE, Hemberger M: **Regulation of early trophoblast differentiation – Lessons from the mouse.** *Placenta* 2010, **31**:944-950.
36. Tesser RB, Scherholz PLA, Nascimento L, Katz SG: **Trophoblast glycogen cells differentiate early in the mouse ectoplacental cone: putative role during placentation.** *Histochemistry and Cell Biology* 2010, **134**:83-92.
37. Zhang JH, Chen Z, Smith GN, Croy BA: **Natural Killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth?** *Cellular & Molecular Immunology* 2011, **8**:1-11.
38. Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R: **Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during last third pregnancy in the rat.** *Placenta* 2006, **27**:22-33.
39. Carpenter SJ: **Light and electron microscopic observations on the morphogenesis of the chorioallantoic placenta of the golden hamster (*Cricetus auratus*). Days seven through nine of gestation).** *American Journal of Anatomy* 1972, **135**:445-476.
40. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I: **The arterial migration of trophoblast in the uterus of golden hamster, *Mesocricetus auratus*.** *Journal of Reproduction and Fertility* 1974, **40**:269-280.
41. Carpenter SJ: **Ultrastructural observations on the maturation of the placental labyrinth of the golden hamster (days 10 to 16 of gestation).** *American Journal of Anatomy* 1975, **143**:315-347.
42. King BF, Hastings RA: **The comparative fine structure of the interhemal membrane of chorioallantoic placentas from six genera of myomorph rodents.** *American Journal of Anatomy* 1977, **149**:165-180.
43. Ferro EAV, Bevilacqua E: **Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae).** *Journal of Morphology* 1994, **221**:139-152.
44. Favaron PO, Carter AM, Ambrosio CE, Morini AC, Mess AM, Oliveira MF, Miglino MA: **Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011, **9**:55A.
45. Francisco AL, Magnusson WE, Sanaiotti TM. **Variation in Growth and Reproduction of *Bolomys lasiurus* (Rodentia: Muridae) in an Amazonian Savanna.** *Journal of Tropical Ecology* 1995, **11**:419-428.
46. Evans HE, Sack WO: **Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references.** *Anatomia, Histologia, Embryologia* 1973, **2**:11-45.
47. Lecarpentier E, Morel O, Tarrade A, Dahirel M, Bonneau M, Gayat E, Evain-Brion D, Chavatte-Palmer P, Tsatsaris V: **Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model of IUGR with three-dimensional power Doppler angiography.** *Placenta* 2012, **33**:769-775.
48. Coan PM, Angiolini E, Sandovici I, Burton GJ, Constância M, Fowden AL: **Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in the mice.** *Journal of Physiology* 2008, **586**:4567-4576.
49. Coan PM, Fowden AL, Constância M, Ferguson-Smith AC, Burton GJ, Sibley CP: **Disproportional effects of *Igf2* knockout on placental morphology and diffusional exchange characteristics in the mouse.** *Journal of Physiology* 2008, **586**:5023-5032.
50. Tissot van Patot MC, Murray AJ, Beckey V, Cindrova-Davies T, Johns J, Zwerdinger L, Jauniaux E, Burton GJ, Serkova NJ: **Human placental metabolic adaptation to chronic hypoxia, high altitude: hypoxic preconditioning.** *American Journal of Physiology. Regulator, integrative and comparative physiology* 2010, **298**:166-172.

51. Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG: **Maternal Undernutrition Influences Placental-Fetal Development.** *Biology of Reproduction* 2010, **83**:325-331.
52. Kurtz H, Zechner U, Orth A, Fundele R: **Link correlation between placenta and offspring size in mouse interspecific crosses.** *Anatomy and Embryology* 1999, **200**:335-343.
53. Soloveva V, Linzer DIH: **Differentiation of Placental Trophoblast Giant Cells Requires Downregulation of p53 and Rb.** *Placenta* 2004, **25**:29-36.
54. Hu D, Cross JC: **Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta.** *The International Journal of Developmental Biology* 2010, **54**:341-354.

Figures:

Figure 1: Placental structure. (A) H&E. Near term placenta in *N. lasiurus* with labyrinth zone (Lz), junctional zone (Jz), and decidua (Dd). (B) H&E. Mouse placenta near term. (C) H&E. Labyrinth in early gestation in *N. lasiurus*. Fetal vessel (FV) and capillaries (FC) had nucleated erythrocytes and differed from maternal blood channels (MBC) with a-nucleated erythrocytes that were lined by trophoblast (TB). Giant cells (GC) were frequent. (D). Vimentin. *N. lasiurus* near term, labyrinth. Positive response in endothelium was used to identify the fetal blood system. Trophoblast borders of the maternal blood spaces and giant cells (GC) were vimentin-negative. Main components were identified, marked and analyzed by the Mercator® software.

Figure 2: Fetomaternal interface. (A) Total volumes of placenta and main regions during gestation in *N. lasiurus* and near term in the mouse (*M. musculus*). (B) Relative volumes of placenta and main regions during gestation in *N. lasiurus* and near term in the mouse.

Figure 3: Results from One Stop Stereology. Relative volumes of the main components in the labyrinth of *N. lasiurus*. **(A)** Fetal vessels. **(B)** Giant cells. **(C)** Trophoblast. **(D)** Maternal blood channels.

Table 1: Fetal and placental weights (g) and feto-placental weight ratio regarded as placental efficiency in *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae) during gestation.

	Early gestation			Mid gestation		Near term placenta	
	10days n=4	11days n=5	13days n=5	15days n=4	16days n=5	21days n=4	22days n=4
Fetal weight (g)	0,0835 ± 0,02043	0,1068 ± 0,01660	0,1028 ± 0,01307	0,5458 ± 0,01586	0,5728 ± 0,01504	0,9733 ± 0,05138	1,038 ± 0,06650
Placental weight (g)	0,05175 ± ,00725	0,0582 ± ,008766	0,0680 ± ,005805	0,0900 ± 0,01235	0,1282 ± 0,02183	0,8650 ± ,007382	0,9213 ± 0,02186
Feto/Placental (g)	0,7530 ± 0,1867	0,5807 ± 0,08380	0,7383 ± 0,1744	0,7977 ± 0,01580	0,8323 ± 0,02759	0,8947 ± 0,03743	0,9025 ± 0,07867

Table 2: Absolute volume (total volume, mm³) and relative volume (%) of the placenta and its main regions: labyrinth, junctional zone, and decidua (mm³) in *Necromys lasiurus*.

	Early (10-11 days)			Mid gestation (15-16 days)				Near term placenta (21-22 days)		
Total volume	4.63	4.78	3.87	13.75	10.01	11.99	16.15	7.28	7.81	7.47
Labyrinth	2.08	2.21	2.22	6.69	6.766	6.26	8.41	4.95	4.40	4.08
Junctional zone	0.94	0.63	0.77	2.97	1.14	3.12	4.06	1.17	2.13	1.72
Decidua	1.60	1.95	0.88	4.08	2.11	2.62	3.68	1.17	1.27	1.68
Relative volume										
Labyrinth	45.05	46.19	57.23	48.67	67.47	52.19	52.10	67.92	56.37	54.58
Junctional zone	20.37	13.12	19.9	21.64	11.42	25.99	25.12	16.08	27.31	22.98
Decidua	34.56	40.68	22.82	29.69	21.10	21.81	22.78	16.02	16.32	22.44

APÊNDICE B

Publicações Científicas Relacionadas à Tese

RESEARCH

Open Access

Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America

Phelipe O Favaron¹, Anthony M Carter², Carlos E Ambrósio³, Adriana C Morini¹, Andrea M Mess¹, Moacir F de Oliveira⁴ and Maria A Miglino^{1*}

Abstract

Background: Sigmodontinae, known as “New World rats and mice,” is a large subfamily of Cricetidae for which we herein provide the first comprehensive investigation of the placenta.

Methods: Placentas of various gestational ages ranging from early pregnancy to near term were obtained for five genera, i.e. *Necromys*, *Euryoryzomys*, *Cerradomys*, *Hylaeamys*, and *Oligoryzomys*. They were investigated by means of histology, immunohistochemistry, a proliferation marker, DBA-lectin staining and transmission electron microscopy.

Results: The chorioallantoic placenta was organized in a labyrinthine zone, spongy zone and decidua and an inverted yolk sac persisted until term. The chorioallantoic placenta was hemotrichorial. The interhemal barrier comprised fetal capillary endothelium and three layers of trophoblast, an outermost, cellular layer and two syncytial ones, with interspersed trophoblast giant cells (TGC). In addition, accumulations of TGC occurred below Reichert's membrane. The junctional zone contained syncytial trophoblast, proliferative cellular trophoblast, glycogen cells and TGC that were situated near to the maternal blood channels. In three of the genera, TGC were also accumulated in distinct areas at the placental periphery. PAS-positive glycogen cells derived from the junctional zone invaded the decidua. Abundant maternal uNK cells with positive response to PAS, vimentin and DBA-lectin were found in the decidua. The visceral yolk sac was completely inverted and villous.

Conclusion: The general aspect of the fetal membranes in Sigmodontinae resembled that found in other cricetid rodents. Compared to murid rodents there were larger numbers of giant cells and in some genera these were seen to congregate at the periphery of the placental disk. Glycogen cells were found to invade the decidua but we did not identify trophoblast in the walls of the deeper decidual arteries. In contrast these vessels were surrounded by large numbers of uNK cells. This survey of wild-trapped specimens from five genera is a useful starting point for the study of placentation in an important subfamily of South American rodents. We note, however, that some of these rodents can be captive bred and recommend that future studies focus on the study of time dated pregnancies.

Background

Muridae and Cricetidae are the most species-rich families of rodents, with around 600 species in each family [1]. For both taxa there are still important gaps in basic knowledge about reproductive biology. In particular, the development of the placenta is not well understood for the majority of species. Muridae includes several laboratory models, such as mouse and rat, for which placentation is very well documented [e.g., 2-9],

yet 98% of the murid species have not been studied with regard to their placentation [10]. Cricetidae is even less well covered although some basic data is available for the golden hamster *Mesocricetus auratus* from the subfamily Cricetinae [11-13]. In addition, some aspects of placentation have been documented for members of the subfamily Arvicolinae, namely voles and lemmings [14,15], and the North American deer mouse *Peromyscus maniculatus* from the subfamily Neotominae [15,16]. But for the largest subfamily, the Sigmodontinae, with 377 recognized species in 74 genera [1], data on placentation is very sparse. The only species studied so far is *Calomys callosus*, which has been used as an

* Correspondence: miglino@usp.br

¹Department of Surgery, School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

experimental model for parasitological and other diseases [17-22].

Sigmodontine rodents form a monophyletic clade [23-25]. These rodents are largely confined to the Neotropics [26], and are often referred to as "New World rats and mice". They are known to transmit diseases to humans and domestic animals. Antibody prevalence indicates that sigmodontine species are reservoirs of Hantavirus in the several regions of Brazil and other parts of Latin America [27]. In addition, they are the most important reservoirs of zoonotic cutaneous leishmaniasis throughout their range [24]. For this reason they are generally considered as pests. On the other hand, sigmodontine rodents usually possess restricted ranges, and are vulnerable to habitat loss. Thus, they may serve as indicators for biodiversity purposes [28]. A better understanding of reproductive biology in these species is therefore desirable and needs to include a comprehensive analysis of placental development and structure.

We here provide a detailed study on placentation in five genera of sigmodontine rodents (*Necromys*, *Euryoryzomys*, *Cerradomys*, *Hylaeamys* and *Oligoryzomys*). Data on reproduction in this subfamily is sparse but where known gestation lasts 23 to 30 days, slightly longer than in mice, rats and other cricetids [9,12,26,29]. Placentas from various gestational stages, ranging from early pregnancy to near term, have been studied by a variety of techniques including immunohistochemistry, DBA-lectin staining and transmission electron microscopy. The findings are compared and contrasted with what is known about placentation in other murid and cricetid rodents.

Methods

Material

Placentae from five genera of sigmodontine rodents were investigated: *Necromys*, *Euryoryzomys*, *Cerradomys*, *Hylaeamys* and *Oligoryzomys* (Table 1). The nomenclature follows a recent revision of the *Oryzomys* complex by Weksler et al. [25]. Most of the material was obtained from the collection of the Museum of Zoology, University of Sao Paulo (MZUSP). Additional material of *Necromys* was obtained from a breeding group at the Universidade Federal Rural do Semi Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte (CEMAS). *Euryoryzomys* was live-trapped at Sao Joaquim da Barra, Sao Paulo (SJB). The identification of *Euryoryzomys* was made by the Laboratory of Ecology and Evolution, Butantan-Institute, Sao Paulo. Voucher material was given to the Museum of Veterinary Anatomy (MAV), University of Sao Paulo. The other material is now housed at the School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo.

The museum specimens had been fixed in formaldehyde and stored in 70% alcohol. Tissue was processed by standard methods, embedded in paraffin (Paraplast; Oxford Labware, St Louis, MO, USA) and sectioned at 5 μ m using an automatic microtome (Leica, RM2155, Germany).

Histology, immunohistochemistry and lectin staining

Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome, picosirius, and periodic acid-Schiff (PAS). In addition, immunohistochemistry was performed following the approaches used in previous studies from our laboratory [see 30,31]. Cytokeratin was used to identify trophoblast cells and was detected by a rabbit polyclonal antibody (1:300; PU071-UP, Biogenex, San Ramon, California, U.S.A.). Mouse monoclonal anti-human primary antibodies were used to detect vimentin (1:300; V9, sc-6260, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), α -smooth muscle actin (1:300; Clone 1A4, DakoCytomation, Carpinteria, California, USA), and PCNA (1:400; PC10, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Negative controls were performed using anti-mouse IgG (1:500; AP308F, Chemicon International Temecula, California, USA) as the primary antibody solution.

In addition, samples from three species (*Necromys lasiurus*, *Hylaeamys megacephalus*, and *Cerradomys* gr. *subflavus*,) were stained using a *Dolichos biflorus* (DBA) lectin to identify mature uNK cells, following the protocol described by Zhang et al. [4].

Transmission electron microscopy

Samples for transmission electron microscopy, derived from freshly obtained material of *Necromys* and *Euryoryzomys*, were fixed in 2.5% glutaraldehyde. Tissues were maintained in this solution for 48 h and post-fixed for 2 h in 2% phosphate-buffered osmium tetroxide (pH 7.4, for 2 h), then washed in phosphate buffer (3×10 min) and immersed in 3% uranyl acetate solution overnight. After being re-washed in buffer (3×10 min), tissues were dehydrated in alcohol and immersed in propylene oxide for 10 min. Finally, the samples were embedded in Spurr's Resin (Polysciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were made on an automatic ultramicrotome (Ultracut R, Leica Microsystems, Germany), contrasted with 2% uranyl acetate and 0.5% lead citrate and studied in a transmission electron microscope (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III camera, Soft Imaging System, Germany).

Results

Macroscopic structure

In all taxa investigated the chorioallantoic placenta was situated at the antimesometrial side of the bicornuate

Table 1 Material collected with values

Species and Collection Number	Geographical Origin	Fetuses			Placentae		
		FL (cm)	FW (g)	PW (g)	PV (ml)	PL (cm)	PD (cm)
<i>Necomys lasiurus</i>							
MAV (CEMAS 03)	Mossoro, RN	Implantation	-	-	-	-	-
MAV (CEMAS 04)	Mossoro, RN	0.5	0.148	0.052	0.2	0.5	0.3
MAV (CEMAS 05)	Mossoro, RN	0.6	0.151	0.065	0.2	0.6	0.4
MZUSP (APC 1140)	Santa Bárbara, SP	1.3	0.377	0.142	0.4	1.1	0.9
MZUSP (APC 1246-1)	Serra Geraldo Tocantins, TO	3.1	3.354	0.696	0.9	1.4	0.7
MZUSP (APC 1246-2)	Serra Geraldo Tocantins, TO	3.1	3.432	0.407	0.5	1.3	1.1
MZUSP (APC 1246-3)	Serra Geraldo Tocantins, TO	2.5	1.964	0.324	0.5	1.2	0.6
MAV (CEMAS 01)	Mossoro, RN	near term	-	-	-	-	-
MAV (CEMAS 02)	Mossoro, RN	near term	-	-	-	-	-
<i>Cerradomys gr. subflavus</i>							
MZUSP (APC 1157)	Santa Barbara, SP	2.8	5.223	0.627	0.9	1.5	1.2
MZUSP (APC 1177)	Santa Barbara, SP	2.0	0.834	0.897	1.0	1.2	0.9
MZUSP (APC 1177-1)	Santa Barbara, SP	2.4	0.329	0.334	0.5	1.1	0.8
MZUSP (APC 1177-2)	Santa Barbara, SP	2.2	0.312	0.299	0.5	1.0	0.7
<i>Euryoryzomys sp.</i>							
MAV (SJB 01)	São Joaquim da Barra, SP	1.6	0.907	-	-	-	-
MAV (SJB 02)	São Joaquim da Barra, SP	1.8	0.933	-	-	-	-
<i>Hylaeamys megacephalus</i>							
MZUSP (APC 1022-1)	Serra das Araras, MT	-	-	0.222	0.1	1.0	0.5
MZUSP (APC 1022-3)	Serra das Araras, MT	-	-	0.095	0.1	1.0	0.6
MZUSP (MRT 08415)	Goiania, GO	1	0.107	0.209	0.4	0.9	0.6
MZUSP (MRT 08408)	Goiania, GO	2.2	1.082	0.538	0.9	1.1	1.0
<i>Oligoryzomys sp.</i>							
MZUSP 32729-1	Cotia and Ibiuna, SP	2.4	1.186	0.079	0.2	1.2	0.8
MZUSP 32729-4	Cotia and Ibiúna, SP	2.3	1.188	0.174	0.3	1.1	0.8
MZUSP 31167	Piedade, SP	1.0	0.118	0.051	0.1	0.6	0.5
MZUSP 32735	Piedade, SP	0.5	0.025	0.075	0.1	0.6	0.5

Fetal length (FL), fetal weight (FW), placental weight (PW), placental volume (PV), placental length (PL) and placental diameter (PD). Most specimens were from the collection of the Museum of Zoology, University of Sao Paulo, SP, Brazil (MZUSP) with temporary museum numbers given in brackets. The nomenclature follows a recent revision of *Oryzomys* by Weksler et al. [25]. Fresh material was collected at CEMAS, Mossoro, RN, and in São Joaquim da Barra (SJP), SP.

uterus and a choriovitelline placenta persisted throughout gestation (Figures 1A-C). The embryos were situated towards the mesometrial side of the uterus. The definitive chorioallantoic placenta was discoidal to ovoid in shape. The junction between the chorion and the uterus was restricted to an area at the antimesometrial side of the uterus (Figures 1B,C). A delicate umbilical cord was attached to the center of the placental disk. The visceral yolk sac was completely inverted at all stages (Figures 1B,C).

Labyrinth

The chorioallantoic placenta was composed of a labyrinth situated towards the fetal or the mesometrial side of the uterus and an inner junctional zone (or trophospongium) adjacent to the decidua (Figures 1B,C). The labyrinth was vascularized from both the maternal and fetal circulations. The maternal blood was found to flow through tubular channels, the maternal blood lacunae or

blood channels (Figure 2A), also found in the junctional zone (Figure 2B). The fetal vessels had intact endothelium, resulting in vimentin-positive response of the labyrinth (Figures 2C,D). The walls of the lacunae were composed of syncytial and cellular trophoblast. In addition to normal-sized trophoblasts, larger cells were interspersed, the sinusoidal trophoblast giant cells (Figure 2A). Thus, the barrier varied in thickness, including thinner and thicker regions. In addition, groups of TGC occurred at the outer border of the labyrinth, adjacent to Reichert's membrane.

Interhemal barrier

The labyrinth is the region of feto-maternal exchange. Trophoblastic trabeculae formed the barrier between the fetal and maternal circulations. In contrast to the fetal system that had intact capillaries, the maternal blood flowed through trophoblast-lined channels (Figures 3A-C). As mentioned above, the thickness of the placental

barrier varied greatly in all taxa investigated, including very thin areas but also thicker parts (Figure 2A). However, the minimal thickness in the two taxa that were studied by electron microscopy was found to be approximately 2.5 μm in *Necromys* and 7 μm in *Euryoryzomys*. The placental barrier comprised three trophoblastic layers (Figures 3B-F), resulting in a hemotrichorial condition. The outermost layer (TI) lined the maternal blood channels. It was cellular in nature (Figures 3E,F). In places this layer (TI) was reduced to a very thin flange, but with projections towards the maternal blood (Figures 3E,F). The middle layer (TII) was much thicker and only loosely attached to the layer above it. It was syncytial in nature (not shown). However, an irregularly folded structure was present. Finally, the innermost layer (TIII) was likewise syncytial (Figures 3B,C). It was very closely attached to the neighboring layer (TII), including tight and intermediate junctions as

well as desmosomes (Figure 3D). Moreover, this layer (TIII) had a strong connection to the basement membrane of the fetal capillary endothelium (Figure 3D). In the areas of the labyrinth that were characterized by a thicker barrier between the two circulations, additional trophoblast and sinusoidal trophoblast giant cells were present below the innermost layer (TIII). It was mostly cellular.

Junctional zone and giant cell region

The junctional zone (Figures 4A,B) abutted the decidual region. It consisted largely of spongiotrophoblast. In most areas, both syncytial and cellular trophoblast were found (Figure 4C), but in some places only a thin syncytial layer was associated with the maternal blood spaces (Figure 4D), whereas in others there were trophoblast cells. The trophoblast cells were actively proliferative, as indicated by PCNA-staining. In early pregnancy, such proliferative trophoblast clustered as nests inside the

Figure 3 Ultrastructure of the labyrinth in mid gestation. (A) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). The placental barrier separated a maternal blood channel (MBC) and a fetal capillary (FC) with intact endothelium (EC) and a red blood cell (RBC). (B) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). The placenta comprised three trophoblastic layers (Tl, TII and TIII). (C) *Euryoryzomys* (MAV/SJB 02). The hemotrichorial placenta. (D) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). There was a strong contact between layer TIII and the basement membrane of the endothelial cell (arrow). Different types of junctions occurred between trophoblast layers TII and TIII, including tight junctions (TJ), intermediate junctions (CJ) and desmosomes (circle). (E) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). The outermost layers in detail. (F) *Euryoryzomys* (MAV/SJB 02). Two cells belonging to layer Tl.

junctional zone (Figure 4E), whereas it was more frequent and distributed throughout this region in more advanced pregnancies (Figures 4F,G). Moreover, trophoblast giant cells were dispersed within the junctional zone, closely associated with the maternal blood channels (Figures 4H). They had large nuclei and prominent chromatin. The largest amount of trophoblast giant cells inside the junctional zone was found in *Oligoryzomys* and *Necromys*, in both closely associated with the spongiotrophoblast. In the three other genera of sigmodontine rodents that had fewer trophoblast giant cells inside the junctional zone - *Cerradomys*, *Hylaeamys* and

Euryoryzomys - trophoblast giant cells were found to be accumulated in distinct regions at the periphery of the placental disk (Figures 5A,B). All investigated genera of sigmodontine rodents possessed a continuous band of trophoblast giant cells, situated between the decidua and the junctional zone (Figure 5C). This band was connected to the region of accumulated trophoblast giant cells in the three above mentioned genera. The giant cells were mostly bi- or multinucleated in nature.

Neither the spongiotrophoblast nor the trophoblast giant cells associated with the junctional zone showed positive reactions to PAS staining. This distinguished

Figure 4 The junctional zone. (A) *Necromys*, early pregnancy (MAV/CEMAS 05). HE. The junctional zone (JZ) with simple structure facing towards the decidua. The border was not sharp with trophoblast derivatives (arrows) invading into the decidua. (B) *Cerradomys*, near term (MZUSP/APC 1157). The junctional zone had a folded structure arranged around the maternal blood channels (MBC). (C) *Necromys*, near term (MAV/CEMAS 02). TEM. Syncytial trophoblast (Syn TS) lined the maternal blood channels (MBC), associated with underlying cellular trophoblast (Cell TS). (D) *Necromys*, near term (MAV/CEMAS 02). TEM. In places the trophoblast separating the maternal blood spaces was represented only by a thin syncytial layer (arrow). (E) *Necromys* in early pregnancy (MAV/CEMAS 05). PCNA. Clustered groups of proliferating trophoblast cells (arrow) occurred in the junctional zone. (F) *Necromys* in mid gestation (MZUSP/APC 1246-1). PCNA. In more advanced stages, proliferating cells were widespread in the junctional zone. (G) *Necromys* in mid gestation (MZUSP/APC 1246-1). PCNA. Higher magnification. (H) *Cerradomys*, near term (MZUSP/APC 1157). HE. Among the spongiotrophoblast in the junctional zone, trophoblast giant cells (TGC) occurred. They were close to the maternal blood spaces and had large nuclei and prominent chromatin.

Figure 5 Giant cells. (A) *Euryoryzomys* in mid gestation (MAV/SJB 01). HE. Trophoblast giant cells (TGC) were accumulated at the outer areas of the placental disk, adjacent to the labyrinth (LAB) and junctional zone (JZ). (B) *Euryoryzomys* in mid gestation (MAV/SJB 02). TEM. Trophoblast giant cells at higher magnification. These cells were binucleate in nature. (C) *Cerradomys*, near term (MZUSP/APC 1177-1). HE. A continuous layer of trophoblast giant cells (TGC) was situated between the junctional zone (JZ) and the decidua (D). Some cells were binucleate (arrow). (D) *Oligoryzomys*, near term (MZUSP 32729-1). HE. Some trophoblast giant cells were multinucleate.

them from another type of cell, the so-called glycogen cells, the only type of fetal cell that showed positive reaction to PAS (Figure 6A). The glycogen cells were present inside the junctional zone as well as on the outer border, from which they invaded into the decidual region (Figures 6A-B). This extraplacental trophoblast was identified by cytokeratin-immunopositivity (Figure 6C), and was vimentin-negative.

Decidua and maternal blood supply

The uterine spiral arteries entered the placenta in the decidual region (Figure 7A). As indicated by immunohistochemistry for vimentin, the mesometrial arteries possessed an intact endothelium (Figure 7B). In contrast, the endothelium of the maternal vessels near the placental disk was not completely intact. Remnants of the endothelium were detected by using vimentin staining (Figure 7C). These findings suggested that the process of trophoblast invasion was restricted to regions adjacent to the placenta. Closely associated with the maternal arteries of the decidua in all species examined, there was a large amount of both smaller and larger cells that possessed PAS-positive granules (Figures 8A, B). Such cells were often found closely grouped together. In some of these cells more than one nucleus was present (Figure 8B). In addition to PAS, these cells reacted positively for vimentin (Figure 8C), indicating

Figure 6 Glycogen cells in mid gestation. (A) *Hylaeamys* (MZUSP/APC 1022-1). PAS. Glycogen cells (arrows) at the outer margin of the junctional zone (JZ) just above the decidua (D). (B) *Necromys* (MZUSP/APC 1140). HE. Glycogen cells (arrows) invading the decidua near a maternal blood channel (MBC) that was entering the placenta. (C) *Necromys* (MZUSP/APC 1140). Immunohistochemistry for cytokeratin confirmed the trophoblastic nature of cells that originated from the junctional zone and invaded the decidua.

that they were derived from mesenchymal tissue and thus must be of maternal origin. They were identified as uterine natural killer cells (uNK cells). In early pregnancy such PAS-positive and vimentin-positive uNK cells were also found near the developing placental disk (Figure 8D). Cells associated with the maternal arteries

Figure 7 Decidua. (A) *Necromys* in mid gestation (MZUSP/APC 1140). HE. Maternal spiral arteries (MA) in the decidua (D) on their way to the junctional zone (JZ). They were associated with large cells (arrows). (B) *Necromys*, near term (MAV/CEMAS 01). Immunohistochemistry for vimentin. An artery in the mesometrium possessed an intact endothelium (arrow). (C) *Oligoryzomys*, near term (MZUSP 32729-1). Immunohistochemistry for vimentin identified remnants of the endothelium (arrow) of a maternal artery.

were not cytokeratin-positive (Figure 8E). The data once more supported their identification as uNK cells and indicated the restricted mode of trophoblast invasion into the decidua. In detail, the uNK cells mostly had large nuclei with irregular or spherical shape and some glycogen granules (Figure 8F). Using DBA-lectin staining (a phenotypic marker for uNK cells), we were able to detect positively reacting uNK cells associated with the blood vessels and inside the decidua (Figure 9A,B).

However, DBA-lectin staining in sigmodontine rodents was not specific to uNK cells, marking also cells inside the labyrinth, the endothelium of the fetal capillaries in particular (Figures 9C,D), as well as the visceral yolk sac epithelium (Figure 9E).

The visceral and parietal yolk sac

An inverted yolk sac placenta was present throughout pregnancy. It was closely attached to the labyrinthine region of the chorioallantoic placenta. The mostly one-layered parietal yolk sac covering was associated with a well-developed Reichert's membrane (Figures 10A-C). Especially in early to mid gestation the visceral yolk sac was highly villous (Figures 10C,D). The outer layer of the yolk sac consisted of visceral endoderm cells with cuboidal shape. The yolk sac endoderm cells reacted positively to PAS, including plenty of granular vesicles. Masson's Trichrome staining in *Cerradomys* suggested hemophagous activity (Figure 10D). In all species investigated, the cells of the yolk sac endoderm were separated by a basement membrane from the underlying mesoderm, which was well vascularized by vitelline blood vessels (Figures 10C, 11A). The nuclei of the visceral yolk sac endoderm were situated near the base of the cells. Their apical surface possessed numerous microvilli (Figure 11A,B). No coated pits were found. The cytoplasm included many rough endoplasmic reticulum cisterns, some glycogen granules, and vesicle-like vacuoles as well as scattered dense droplets with a great variability of shape and size (Figures 11B-D). In addition, intracellular spaces were evident in the endodermal cells (Figure 11D). The vitelline vessels included capillaries with fenestrated regions of endothelium (Figures 11E,F).

Discussion

Sigmodontinae is a South American radiation of cricetid rodents. Placentation in this speciose subfamily has been little studied and information is limited to a single species *Calomys callosus* [17-22]. Our aim therefore was to study a broader sample. Whilst we were able to study different gestational stages from five genera these were collected mainly in the wild. In contrast to studies of laboratory rodents we did not have carefully spaced specimens of known gestational age.

As in other murid and cricetid rodents, the chorioallantoic placenta consisted of three readily identifiable zones: labyrinth, junctional zone and decidua. An inverted choriovitelline or yolk sac placenta persisted until term. Because this basic design resembles that of the mouse, for which placental development and cell lineages are best understood [2,3,5-8,32-38], our findings are discussed in relation to this species as well as to other cricetid rodents such as the golden hamster, lemming and deer mouse [13-16].

Figure 8 Uterine natural killer (uNK) cells. (A/B) *Oligoryzomys* in mid gestation (MZUSP 31167). PAS-positive cells accumulated near the maternal blood vessel (MA) in the decidua (D). Some were binucleated (arrows). (C) *Oligoryzomys* in early pregnancy (MZUSP 32735). Positive response to vimentin indicated that the cells were of mesenchymal origin, representing maternal uNK cells, not trophoblast. (D) *Necromys* in early pregnancy (MAV/CEMAS 04). Vimentin. In early gestation, the uNK cells were frequent also near to the outer margin of the placental disk (CA), which consisted of spongiotrophoblast and was vimentin-negative. (E) *Necromys* in early pregnancy (MAV/CEMAS 04). Immunostaining for cytokeratin. The negative response indicated that the invasion of trophoblast cells was limited to areas near the placenta. (F) *Euryoryzomys* in early pregnancy (MAV/SJB 01). TEM. The uNK cells in the decidua possessed large spherical nuclei (N) with irregular shape and distinct nucleoli (NC).

Labyrinth and interhemal barrier

The labyrinth consisted of maternal blood channels enclosed by trophoblast and running roughly parallel to fetal capillaries. As in other murid [16] and cricetid [11,12,15,16,21] rodents, there were three layers of trophoblast, the inner two syncytial and the outer one cellular. Details of the structure of the interhemal barrier, such as the variation in thickness and the complex infolding of layer TII, were similar to what has been described in other subfamilies of cricetid rodents [12,17]. In the mouse all three trophoblast layers are derived from the

same lineage [6]. They have distinct patterns of gene expression, however, and form discrete populations early in development [34]. Whilst we did find giant cells in the labyrinth, it remains to be shown if they are equivalent to the sinusoidal giant cells identified in the mouse on the basis of gene expression and polyploidy [34,37]. Although a hemotrichorial placenta is present in all murid and cricetid rodents so far examined, there are seven known variants of the interhemal barrier in rodents [39] and our previous analysis suggested that the hemotrichorial type of barrier is a derived character state [39].

Figure 9 DBA-lectin staining in *Cerradomys* in mid gestation (MZUSP/APC 1177). (A) Positively reacting cells in the decidua that were usually in close association with maternal blood vessels. (B) They possessed large amounts of granules and represented mature uNK cells. (C) DBA-lectin staining also marked cells inside the labyrinth, particularly the endothelium of the fetal capillaries (arrow). (D) The same at higher magnification. (E) The visceral yolk sac epithelium was stained by DBA-lectin.

Junctional zone

As in other murid and cricetid placentae [6,13,33], there was a prominent junctional zone devoid of fetal vessels but with large trophoblast-lined maternal blood spaces. Two distinct types of trophoblast are found here: spongiotrophoblasts and glycogen cells. They were long thought to have a common origin but glycogen cells may be derived from precursors in the ectoplacental cone that, like them, express protocadherin 12 [40]. In the mouse placenta at E16.5 about 40% of the spongy zone is made up of glycogen cells but the proportion diminishes towards term [3]. We found relatively few glycogen cells in our specimens but this was difficult to interpret since gestational ages were not known.

Trophoblast giant cells

The classical giant cells of the rodent placenta, first recognized by their large size and high degree of polyploidy [41], are now referred to as parietal TGCs [34]. A few of them, sometimes known as primary giant cells, are derived from the mural trophoblast, but the majority comes from the *Tpbpa*-negative lineage of the polar trophoblast [6]. In the mouse they form a nearly continuous layer that marks the boundary between fetal and maternal tissues, although this boundary is breached once the glycogen cells begin to invade the decidua. As expected, parietal TGCs were found at this location in the sigmodont placenta. In addition, in three genera, the giant cells formed a layer many cells thick at the margin of the disk. A similar accumulation of giant cells is not known from mouse placenta where the total population of parietal TGCs is estimated to be only twenty thousand [3].

Decidua and maternal blood vessels

The extent to which trophoblast invades maternal blood vessels differs among murid rodents [9]. In the mouse it has been thought for many years that trophoblast invasion is confined to vessels in the fetal part of the placenta [42]. In contrast, in the rat, trophoblast invasion by the endovascular route plays an important part in remodeling of the uterine spiral arteries [9,43]. More recently it has been recognized that in mouse some trophoblasts migrate by a perivascular route and end up in the lumen of the maternal arteries [2,34]. Trophoblast invasion of maternal arteries certainly occurs in the golden hamster, a cricetid rodent [13,44]. In contrast, in sigmodonts, we did not find cytokeratin-positive cells in the walls of the spiral arteries and the vessel endothelium was largely intact. Cytokeratin-positive cells were not found in the mesometrial triangle. Whilst this is suggestive of shallow trophoblast invasion in sigmodonts, it clearly is an aspect that needs to be systematically explored in specimens of known gestational age.

Figure 10 Parietal and visceral yolk sac. (A) *Necromys* in early pregnancy (MAV/CEMAS 04). Masson's Trichrome. The parietal yolk sac (PYS) was one layered and associated with a well-developed Reichert's membrane (arrowhead). (B) *Necromys* in early pregnancy (MAV/CEMAS 05). HE. Adjacent to the labyrinth and its maternal blood channels (MBC), trophoblast giant cells (arrow) were present. (C) *Cerradomys* in mid gestation (MZUSP/APC 1177-2). HE. The visceral yolk sac (VYS) was villous and supplied by vitelline blood vessels (arrows). It was close to the placental disc and the very thin parietal yolk sac that covered it (arrowheads). (D) *Cerradomys* in mid gestation (MZUSP/APC 1177-2). Masson's Trichrome. Positively reacting endodermal cells that were partly binucleate.

Figure 11 Ultrastructure of the visceral yolk sac in mid gestation. (A) *Euryoryzomys* (MAV/SJB 02). The endoderm possessed apical microvilli (arrows) and basal nuclei (N). They were close to the vitelline capillaries (VC). (B) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). Rough endoplasmic reticulum (RER) and vacuole-like vesicles (VV) in the cytoplasm. (C) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). Electron-dense inclusions (D). (D) *Euryoryzomys* (MAV/SJB 02). Glycogen deposits (Gly), endocytic vesicles (EV) and large intracellular spaces (ICS) were evident in the apical cytoplasm. (E) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). An endothelial cell of a vitelline capillary with fenestrated regions (arrows). (F) *Necromys* (MZUSP/APC 1246-3). Higher magnification.

Uterine NK cells

The uNK cells are the dominant leukocyte population in the gravid uterus of rodents and primates. In human pregnancy they are responsible for the earliest events in spiral artery transformation, which occur prior to trophoblast invasion [45]. In the mouse they play an even greater role in adaptation of the maternal arteries, which fail to widen in the absence of uNK cells [46]. Although murine uNK cells produce a number of cytokines, the key molecule appears to be interferon-gamma [47]. For cricetid rodents, the presence of uNK cells in the walls of transformed spiral arteries was first shown in the golden hamster [13]. We have shown that they are

present in large numbers in sigmodont rodents and are similarly associated with the spiral arteries. It is likely that they play an important role in vessel widening and remodeling similar to what has been shown experimentally in the mouse.

Parietal and visceral yolk sac

The yolk sac was no different in structure from what has been described for other murid and cricetid rodents [10,14,48-50]. Recently it was reported [50] that there are no caveolae-like structures in the yolk sac endoderm of the mouse. Likewise, this appears to be the case in *Necromys* and *Euryoryzomys*, the two sigmodonts we

examined by TEM. This is an interesting contrast to what consistently is found in the guinea pig [51] and other hystricognath rodents [e.g. 31,52,53].

Implications for the biology of sigmodont rodents

The sigmodont rodents reached South America at the time of the Great American Interchange in the Pliocene Epoch or perhaps even earlier [54]. They underwent a rapid radiation that led them to occupy a variety of habitats, including the xeric biomes *Cerrado* and *Caa-tinga* of Brazil [54,55]. Despite their potential importance as bioindicators [28] and their undoubted significance as reservoirs of disease [27], they are much less well studied than, for example, the hystricomorph rodents of Latin America (e.g. [30,31,51-53,56-58]).

In most respects placentation in this subfamily closely resembles what has been described for other cricetid rodents [13,15]; the close similarity in the fine structure of the interhemal barrier has already been remarked upon. As we have shown elsewhere, the hemotrichorial type of placenta first appeared in the common ancestor or murid and cricetid rodents [39]. Likewise the prominent role of maternal uNK cells in placentation is a feature that sigmodonts share with other cricetid and murid rodents [13,46]. The most striking finding in the present material was the relative abundance of trophoblast giant cells first described in *Calomys* [19] and here extended to a further five genera. In murid rodents giant cells produce a wide range of hormones and cytokines such as proliferin [59] and the significance of the expanded giant cell population in sigmodonts cries for closer attention.

It is, however, unlikely that our understanding of placentation in this subfamily can be further advanced by field studies. It would be better to establish a breeding program and obtain a series of time dated pregnancies from a single species such as *Calomys callosus* or *Necomys lasiurus*, both of which have been bred in captivity. The feasibility of such an approach is apparent from an earlier study of trophoblast invasion at the start of pregnancy [17].

Conclusions

In summary the general aspect of the fetal membranes in Sigmodontinae resembled that found in other cricetid rodents. The chorioallantoic placenta was organized in a labyrinthine zone, junctional zone and decidua and an inverted yolk sac persisted until term. The interhemal barrier was of the hemotrichorial type. The junctional zone was comprised of spongiotrophoblast, glycogen cells and trophoblast giant cells. Compared to murid rodents there were much larger numbers of giant cells and in some genera these were seen to congregate at the periphery of the placental disk. Glycogen cells were found to invade the decidua but we did not identify

trophoblast in the walls of the deeper decidual arteries. In contrast these vessels were surrounded by large numbers of uNK cells. This survey of wild-trapped specimens from five genera is a useful starting point for the study of placentation in an important subfamily of South American rodents. We note, however, that some of these rodents can be captive bred and recommend that future studies focus on the study of time dated pregnancies.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Mario de Vivo, Curator of Mammals at the Zoology Museum of the University of Sao Paulo, Brazil, for the loan of sigmodontine specimens and Dr. Rodrigo Del Vale and his working group at Sao Joaquim da Barra for providing additional material. We are grateful for technical support to several members of the University Sao Paulo and the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte. This research was supported by grants from FAPESP (Proc. 07/51491-3 and 09/53392-8).

Author details

¹Department of Surgery, School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. ²Cardiovascular and Renal Research, Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark. ³Department of Basic Science, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil. ⁴Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

Authors' contributions

AMC and MAM devised the study and participated in its design and coordination. POF performed the major part of the histological analysis. CEA, ACM, MFO and AMM participated in the study design and analysis. AMC, AMM and POF wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 3 February 2011 Accepted: 25 April 2011

Published: 25 April 2011

References

- Musser GG, Carleton MD: **Superfamily Muroidea**. In *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Edited by: Wilson DE, Reeder DM. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005:894-1531.
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC: **Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta**. *Dev Biol* 2002, **250**:358-373.
- Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC: **Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta**. *Develop Dynamics* 2006, **235**:3280-3294.
- Zhang JH, Yamada AT, Croy BA: **DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua**. *Placenta* 2009, **30**:968-973.
- Zhang JH, Chen Z, Smith GN, Croy BA: **Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth?** *Cell Molec Immunol* 2011, **8**:1-11.
- Hu D, Cross JC: **Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta**. *Int J Dev Biol* 2010, **54**:341-54.
- Senner CE, Hemberger M: **Regulation of early trophoblast differentiation - Lessons from the mouse**. *Placenta* 2010, **31**:944-950.
- Tesser RB, Scherholz PLA, Nascimento L, Katz SG: **Trophoblast glycogen cells differentiate early in the mouse ectoplacental cone: putative role during placentation**. *Histochem Cell Biol* 2010, **134**:83-92.
- Verduysey L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R: **Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat**. *Placenta* 2006, **27**:22-33.

10. Mess A: Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *J Exp Zool (Comp Exp Biol)* A 2003, **299**:78-98.
11. Carpenter SJ: Light and electron microscopic observations on the morphogenesis of the chorioallantoic placenta of the golden hamster (*Cricetus auratus*). Days seven through nine of gestation. *Am J Anat* 1972, **135**:445-476.
12. Carpenter SJ: Ultrastructural observations on the maturation of the placental labyrinth of the golden hamster (days 10 to 16 of gestation). *Am J Anat* 1975, **143**:315-47.
13. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I: The arterial migration of trophoblast in the uterus of golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J Reprod Fertil* 1974, **40**:269-80.
14. Sansom GS: Early development and placentation in *Arvicola* (*Microtus*) *amphibius*, with special reference to the origin of the placental giant cells. *J Anat Lond* 1922, **56**:333-365.
15. King BF, Hastings RA: The comparative fine structure of the interhemal membrane of chorioallantoic placentas from six genera of myomorph rodents. *Am J Anat* 1977, **149**:165-180.
16. Enders AC: A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *Am J Anat* 1965, **116**:29-67.
17. Ferro EAV, Bevilacqua E: Trophoblastic invasion of the uterine epithelium in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *J Morphol* 1994, **221**:139-152.
18. Ferro EAV, Bevilacqua E, Favoreto-Junior S, Silva DAO, Mortara RA, Mineo JR: *Calomys callosus* (Rodentia:Cricetidae) trophoblast cells as host cells to toxoplasma gondii in early pregnancy. *Parasitol Res* 1999, **85**:647-654.
19. Moraes N, Zago D, Gaglioti S, Hoshida MS, Bevilacqua E: NADPH-diaphorase activity and nitric oxide synthase isoforms in the trophoblast of *Calomys callosus*. *J Anat* 2001, **198**:443-453.
20. Ferro EA, Silva DA, Bevilacqua E, Mineo JR: Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun* 2002, **70**:7089-7094.
21. Limongi JE, Ferro EAV: Barreira placentária de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Biosc J* 2003, **19**:89-94.
22. Franco PS, Silva DAO, Costa IN, Gomes AO, Silva ALN, Pena JDO, Mineo JR, Ferro EAV: Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. *Placenta* 2011.
23. Weksler M: Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol Phylogenet Evol* 2003, **29**:331-49.
24. Jansa SA, Weksler M: Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2004, **31**:256-276.
25. Weksler M, Percequillo AR, Voss RS: Ten new genera of Oryzomyine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *Am Mus Nov* 2006, **3537**:1-29.
26. Eisenberg JF, Redford KH: *Mammals of the Neotropics*. Ecuador, Bolivia, Brazil. Chicago: Chicago University Press; 2000:3:1-624.
27. Figueiredo LT, Moreli ML, de-Souza RL, Borges AA, de-Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, de-Souza RP, de-Souza LT, Braconi CT, Harsi CM, de-Andrade-Zanotto PM, Viral diversity Genetic Network Consortium: Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:561-7.
28. Püttker T, Pardini R, Meyer-Lucht Y, Sommer S: Response of five small mammal species to micro-scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic Forest remnants, Brazil. *MBC Ecol* 2008, **8**:9.
29. Francisco AL, Magnusson WE, Sanaiotti TM: Variation in growth and reproduction of *Bolomys lasiurus* (Rodentia: Muridae) in an Amazonian savanna. *J Trop Ecol* 1995, **11**:419-428.
30. Oliveira MF, Mess A, Ambrósio CE, Dantas CAG, Favaron PO, Miglino MA: Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reprod Biol Endocrinol* 2008, **6**:39.
31. Kanashiro C, Santos TC, Miglino MA, Mess AM, Carter AM: Growth and development of the placenta in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol* 2009, **7**:57.
32. Bevilacqua EM, Abrahamsen PA: Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch Biol Med Exp* 1989, **22**:107-118.
33. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ: Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002, **23**:3-19.
34. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC: Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol* 2007, **304**:567-578.
35. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ: Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod* 2004, **70**:1806-1813.
36. Simmons DG, Cross JC: Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev Biol* 2005, **284**:12-24.
37. Hemberger M: Characteristics and significance of trophoblast giant cells. *Placenta* 2008, **28**(Suppl 1):4-9.
38. Hemberger M: Genetic-epigenetic intersection in trophoblast differentiation: implications for extraembryonic tissue function. *Epigenetics* 2010, **5**:24-29.
39. Mess AM, Carter AM: Evolution of the interhaemal barrier in the placenta of rodents. *Placenta* 2009, **30**:914-918.
40. Bouillot S, Rampon C, Tillet E, Huber P: Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta* 2006, **27**:882-888.
41. Zybina TG, Zybina EV: Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. *Cell Biol Int* 2005, **29**:1071-1083.
42. Redline RW, Lu CY: Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab Invest* 1989, **61**:27-36.
43. Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R: Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 2005, **26**:574-584.
44. Pijnenborg R: Placentation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). Thesis, Katholieke Universiteit Leuven Leuven: acco; 1975, 1-144.
45. Harris LK: Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* 2010, **31**(Suppl 1):S93-S98.
46. Croy BA, Di Santo JP, Greenwood JD, Chantakru S, Ashkar AA: Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy-a review. *Placenta* 2000, **21**(Suppl A):S77-S80.
47. Monk JM, Leonard S, McBey BA, Croy BA: Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. *Placenta* 2005, **26**:835-838.
48. Jollie WP: Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 1990, **41**:361-81.
49. King BF, Enders AC: Comparative development of the mammalian yolk sac. In *The human yolk sac and yolk sac tumors*. Edited by: Nogales FF. Berlin: Springer-Verlag; 1993:1-32.
50. Mohanty S, Anderson CL, Robinson JM: The expression of caveolin-1 and the distribution of caveolae in the murine placenta and yolk sac: Parallels to the human placenta. *Placenta* 2010, **31**:144-150.
51. King BF, Enders AC: The fine structure of the guinea pig visceral yolk sac placenta. *Am J Anat* 1970, **127**:397-414.
52. Mess A: Chorioallantoic and yolk sac placentation in the dassie rat *Petromus typicus* and its significance for the evolution of Hystricognath Rodentia. *Placenta* 2007, **28**:1229-1233.
53. Miglino MA, Franciolli ALR, Oliveira MF, Ambrosio CE, Bonatelli M, Machado MRF, Mess A: Development of the inverted visceral yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Placenta* 2008, **29**:748-752.
54. Almeida FC, Bonvicino CR, Cordeiro-Estrela P: Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Mol Phylogenet Evol* 2006, **42**:449-466.
55. Bonvicino CR, Lemos B, Weksler M: Small mammals of Chapada dos Veadeiros National Park (Cerrado of Central Brazil): ecologic, karyologic, and taxonomic considerations. *Braz J Biol* 2005, **65**:395-406.
56. Luckett WP: Superordinal and intraordinal affinities of rodents: developmental evidence from the dentition and placentation. In *Evolutionary Relationships among Rodents Volume 92*. Edited by: Luckett WP, Hartenberger J-L. New York: Plenum Press, NATO ASI-Series; 1985:227-276.
57. Mess A: Development of the chorioallantoic placenta in *Octodon degus* - a model for growth processes in caviomorph rodents? *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* B 2007, **308**:371-383.
58. Mess A: The guinea pig placenta: model of placental growth dynamics. *Placenta* 2007, **28**:812-815.

59. Hemberger M, Nozaki T, Masutani M, Cross JC: Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. *Dev Dyn* 2003, **227**:185-191.

doi:10.1186/1477-7827-9-55

Cite this article as: Favaron *et al.*: Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011 **9**:55.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

Short communication

An unusual feature of yolk sac placentation in *Necomys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)

P.O. Favaron^a, A.M. Carter^b, A.M. Mess^a, M.F. de Oliveira^c, M.A. Miglino^{a,*}

^a Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, University of Sao Paulo, 05508-270, Sao Paulo, Brazil

^b Cardiovascular and Renal Research, Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

^c Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 9 February 2012

Keywords:

Choriovitelline placenta

Histotroph

Evolution

ABSTRACT

We studied the development of the inverted yolk sac in a New World rodent, *Necomys lasiurus* during early placentation. Ten implantation sites were investigated by means of histology, immunohistochemistry and electron microscopy. The yolk sac was villous near its attachment to the placenta. Elsewhere it was non-villous and closely attached to the uterus. The uterine glands were shallow and wide mouthed. They were associated with vessels and filled with secretion, suggesting the release of histotroph. This feature was absent at later stages. The intimate association of the yolk sac with specialized glandular regions of the uterus may represent a derived character condition of *Necomys* and/or sigmodont rodents.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The rodent yolk sac persists throughout gestation, yet its functions are not well understood [1,2]. The visceral yolk sac is inverted such that the endoderm faces the uterine lumen and endometrium [2]. Its functions likely include histotrophic nutrition [2–4], although it also is associated with antibody transfer [5], hematopoiesis [6,7] and hormone synthesis [8]. Only a small number of species has been studied and especially the early stages of yolk sac development are seldom described [9]. In the course of a wider survey of placentation in Sigmodontinae or New World mice [10] we noticed an unusual feature of the yolk sac during early placentation in the hairy-tailed akodont (*N. lasiurus* Lund, 1841). This is a small rodent of 60 g body mass and a gestational period of 23 days, widely distributed in South American savannas [11].

2. Methods

Ten implantation sites of *N. lasiurus*, derived from four females and ranging from day 10–14, were obtained from a breeding group at the University of Mossoró, Brazil. Following a previous study [10], samples were examined by means of light microscopy (hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff (PAS)), immunohistochemistry (vimentin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)), scanning and transmission electron microscopy.

3. Results and discussion

The inverted yolk sac was villous near its attachment to the fetal surface of the chorioallantoic placenta. The villi were well vascularized. The endoderm formed an outermost layer of cells hexagonal in shape with numerous microvilli (Fig. 1A,B). Electron dense droplets and vacuoles (Fig. 1B) and a positive response to PAS (Fig. 1C) indicated activity in glycosylation processes. Cells of the endoderm and the mesoderm were active in proliferation (Fig. 1D). These characteristics were maintained throughout gestation [10], and occur in related species [10,12,13].

Distal to the placenta the yolk sac was not villous, and was closely attached to the uterine wall (Fig. 2A). Numerous vessels were seen in the yolk sac mesoderm (Fig. 2A). The uterine glands were rather shallow and wide mouthed giving the appearance of indentations from the surface. They were associated with blood vessels and connective tissue (Fig. 2B). The uterine glands were lined with high columnar epithelium that was negative to vimentin (Fig. 2B). Cells in these areas reacted positively to PAS, as did those of the yolk sac mesoderm and endoderm (Fig. 2C). In addition, the material in the lumen of the glands as well as that between the uterus and the yolk sac was PAS positive (Fig. 2C). Cells in the connective tissue around the vessels were active in proliferation (Fig. 2D). These data suggest that a transfer of histotroph via the non-villous areas of the yolk sac may occur during early placentation. However, the close association disappeared at later stages when only loose contact occurred [10]. Likewise in related species [10,12–18] the visceral yolk sac seems to

* Corresponding author. Tel./fax: +55 11 30917690.
E-mail address: miglino@usp.br (M.A. Miglino).

Fig. 1. Visceral yolk sac near the chorioallantoic placenta. (A) Day 14. SEM. The endoderm cells (ENDO) were hexagonal in shape. (B) Day 13. TEM. The apical surface was covered by microvilli. Vacuoles (V), electron dense inclusions and dense droplets (arrows) occurred in the cytoplasm. (C) Day 11. PAS. Positive response of the endoderm cells (arrows). (D) Day 11. PCNA. Proliferating activity was high in cells of the endoderm and mesoderm (arrows). Negative control performed by using mouse IgG as the primary antibody [10].

Fig. 2. Contact between yolk sac and uterine wall at day 10. (A) Hematoxylin and eosin. The endoderm (ENDO) of the visceral yolk sac (VYS) attached to areas of the uterus (UT) that were rich in glands (arrows) and associated with blood vessels (V) in the uterine endometrium (UT END). (B) Vimentin. The uterine glands were shallow and lined with high columnar, vimentin-negative epithelium (EPI), associated with vimentin-positive connective tissue (arrows) and vessels. (C) PAS. Positive response occurred in the uterine epithelium and in the yolk sac tissues (arrowheads). In addition, the material in the lumen of the glands (arrows) as well as that between the uterus and the yolk sac was PAS positive too. (D) PCNA. Cells in the visceral yolk sac (VYS), especially those of around the vessels (V) and facing towards the embryo were active in proliferation (arrows). Negative controls (B,F) were performed with mouse IgG [10].

be in less intimate contact. In the Eurasian water vole (*Arvicola amphibius*), another cricetid rodent, the embryo develops within an implantation chamber and there is no contact between yolk sac and uterus until shortly before parturition [12]. In the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), also a cricetid, the visceral yolk sac was facing the uterine epithelium; however, no intimate association nor gland structures as described here could be inferred from the figures or the text of relevant publications [16,17]. The same seems to be the case for the striped desert hamster (*Phodopus sungorus*) [18]. The close association of the visceral yolk sac to specialized regions of the uterus that possessed simple branched, wide mouthed glands during early placentation may represent a derived character condition of *Necromys* and/or sigmodont rodents.

Acknowledgements

We thank the University of Sao Paulo and the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró for technical support. This research was supported by grants from FAPESP (Process number: 09/53392-8).

References

- [1] Mossman HW. Vertebrate fetal membranes: comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance; basic functions; research opportunities. London: The Macmillan Press; 1987. p. 383.
- [2] Enders AC, Carter AM. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition – A review. *Placenta* 2006;27(Suppl. A):11–6.
- [3] Chan STH, Wong PYD. Evidence of active sodium transport in the visceral yolk sac of the rat in vitro. *Physiol* 1978;279:385–94.
- [4] King BF, Enders AC. The fine structure of the guinea pig visceral yolk sac placenta. *Am J Anat* 1970;127:397–414.
- [5] Laliberté F, Muccielli A, Laliberté MF. Dynamics of antibody transfer from mother to fetus through the yolk sac in the rat. *Biol Cell* 1984;50:255–61.
- [6] Palis Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 2001;29:927–36.
- [7] Lux CT, Yoder MC. Novel methods for determining hematopoietic stem and progenitor cell emergence in the murine yolk sac. *Int J Dev Biol* 2010;54:1003–9.
- [8] López-García C, López-Contreras AJ, Cremades A, Castells MT, Marín F, Schreiber F, et al. Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice. *Endocrinology* 2008;149:5012–23.
- [9] Mess A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *J Exp Zool (Comp Exp Biol)* 2003;299:78–98.
- [10] Favaron PO, Carter AM, Ambrosio CE, Morini AC, Mess AM, Oliveira MF, et al. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:55.
- [11] Francisco AL, Magnusson WE, Sanaïotti TM. Variation in growth and reproduction of *Bolomys lasiurus* (Rodentia: Muridae) in an Amazonian Savanna. *J Trop Ecol* 1995;11:419–28.
- [12] Sansom GS. Early development and placentation in *Arvicola* (*Microtus*) *amphibius*, with special reference to the origin of the placental giant cells. *J Anat Lond* 1922;56:333–65.
- [13] Jollie WP. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 1990;41:361–81.
- [14] King BF, Enders AC. Comparative development of the mammalian yolk sac. In: Nogales FF, editor. *The human yolk sac and yolk sac tumors*. Berlin: Springer; 1993. p. 1–32.
- [15] Mohanty S, Anderson CL, Robinson JM. The expression of caveolin-1 and the distribution of caveolae in the murine placenta and yolk sac: parallels to the human placenta. *Placenta* 2010;31:144–50.
- [16] Carpenter SJ. Light and electron microscopic observations on the morphogenesis of the chorioallantoic placenta of the golden hamster (*Cricetus auratus*). days seven through nine of gestation. *Am J Anat* 1972;135:444–76.
- [17] Carpenter SJ. Ultrastructural observations on the maturation of the placental labyrinth of the golden hamster (days 10 to 16 of gestation). *Am J Anat* 1975;143:315–48.
- [18] Benirschke K. Siberian hamster *Phodopus sungorus*. comparative placentation, <http://medicine.ucsd.edu/cpa/>; 2005.

APÊNDICE C

Outras Publicações Científicas

- ALBERTO M.V., MEIRELLES, F.V., PERECIN F., AMBRÓSIO C.E., FAVARON, P.O., FRANCIOLLI, A.L.R., MESS A.M., SANTOS, J.M., RICI R.E.G., BERTOLINI M., MIGLINO M. A. Development of bovine embryos derived from reproductive techniques. **Reproduction, Fertility and Development**, 2012.
- OLIVEIRA M.F., VALE A.M., FAVARON P.O., VASCONCELOS B.G., OLIVEIRA G.B., MIGLINO M.A., MESS A. Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). **Placenta** (Eastbourne), v.33, 876-881, 2012.
- WILL S.E.A., MORINI JUNIOR J.C., ALCÂNTARA D., FRATINI P., FAVARON P.O., MIGLINO M.A., ASSIS NETO A.C. Stem Cell Therapy to Restore Pancreatic Function in Dogs and Cats. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, p.99 - 105, 2012.
- REZENDE L.C., BARBEITO C.G., FAVARON P.O., MESS A., MIGLINO M.A. The fetomaternal interface in the placenta of three species of armadillos (Eutheria, Xenarthra, Dasypodidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, p.38 -, 2012.
- TIVANE C., RODRIGUES M.N., FAVARON P.O., ASSIS NETO A.C., BIRGEL-JUNIOR E.H., MIGLINO M.A. Mechanisms of calcium transport across the placenta: Review. **Open Journal of Animal Sciences**. 2012.
- FAVARON P.O., CARTER A.M., MESS A.M., OLIVEIRA M.F., MIGLINO M.A. An unusual feature of yolk sac placentation in *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). **Placenta**, v.33, p.578 - 580, 2012.
- SCHÄFER B.T., MALAVASI C.E., RICI R.E.G., AMBRÓSIO C.E., AMORIM A.F., FAVARON P.O., MIGLINO M.A. Morphological observations of ampullae of lorenzini in *Squatina guggenheim* and *S. occulta* (Chondrichthyes, Elasmobranchii, Squatinidae). **Microscopy Research and Technique**, v.75, p.1213-1217, 2012.
- BIASI C., BORELLI V., BENEDICTO H.G., PEREIRA M.R., FAVARON P.O., BOMBONATO P.P. Análise comparativa entre a vascularização ventricular e do nó sinoatrial em gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.78 - 82, 2012.
- FAVARON P.O., MIGLINO M.A., OLIVEIRA M.F., BIASI C.M., RODRIGUES M.N. Embryonic and Fetal Development in - Pigmy Rice Rat - *Oligoryzomys* sp. (Rodentia, Sigmodontinae) and its Significance for Being a new Experimental Model. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.41, p.286-299, 2012.
- PIERI N.C.G., FLAMINI M.A., BARBEITO C.G., CASALS J.B., ROQUE B.K., FAVARON P.O., MIGLINO M.A., MARTINS D. S. Forma e função dos músculos perineais da viscacha (*Lagostomus maximus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.183 - 187, 2012.
- FERNANDES R.A., COSTOLA-SOUZA C., SARMENTO C.A.P., GONÇALVES L., FAVARON P.O., MIGLINO M.A. Placental tissues as sources of stem cells - Review. **Open Journal of Animal Science**, v.2, p.247 - 248, 2012.
- ASSIS NETO A.C., GALDOS A.C., MANÇANARES A.C.F., ALBERTO M.L.V., AMBROSIO C.E., FAVARON P.O., MEIRELLES F.V., MIGLINO M.A. Abnormalities in bovine conceptus development during the embryonic phase after InVitro Fertilization (IVF) and cloning by nuclear transfer (NT). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.223-226, 2011.
- BARBINO M.T., OLIVEIRA C.M., FONSECA E.T., FAVARON P.O., RODRIGUES M.N., MIGLINO M.A. Anatomia do coração de fetos de Guinéa pig em final de gestação (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758]). **Biotemas**, v.24, p.91 - 96, 2011.
- BARBINO M.T., OLIVEIRA C.M., FONSECA E.T., FAVARON P.O., RODRIGUES M.N., MIGLINO, M. A. Anatomia do fígado de fetos de Guinéa pig em final de gestação (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758]). **Biotemas**, v.24, p.97 - 103, 2011.
- DE MELO A.P.F., DE SOUZA W.M., RODRIGUES R.F., ALVES F.R., RICI R.E.G., GUERRA R.R., FAVARON P.O., MIGLINO M.A., DI DIO L.J.A. Anatomical Description of Arterial Segments of the

Spleen of Deer. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.40, p.243-248, 2011.

FERREIRA A.O., MORINI A.C., FAVARON P.O., PASSOS C.C., CAMPOS D.B., MIGLINO M.A., GUERRA R.R. Avaliação morfológica das membranas fetais e da placenta do *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) de vida livre no terço inicial da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.631 - 635, 2011.

FLAMINI M.A., PORTIANSKY E., FAVARON P.O., MARTINS D.S., AMBROSIO C.E., MESS A., MIGLINO M.A., BARBEITO C.G. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) - A caviomorph rodent with natural polyovulation. **Placenta** (Eastbourne), v.32, p.963 - 968, 2011.

OLIVEIRA M.F., FAVARON P.O., AMBROSIO C.E., MIGLINO M.A., MESS A. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the Evolution of Hystricognath Rodents. **Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution**, v.318, p.13-25, 2011.

FRANCIOLLI A.L.R., AMBROSIO C.E., OLIVEIRA M.F., MORINI A.C., FAVARON P.O., MACHADO M.R.F., MIGLINO M.A. Os Histricomorfos Brasileiros: uma análise comparativa do desenvolvimento embriológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.441 - 446, 2011.

FAVARON P.O., CARTER A.M., AMBROSIO C.E., MORINI A.C., MESS A., OLIVEIRA M.F., MIGLINO M.A. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, p.1 - 11, 2011.

RODRIGUES G.S., GUERRA R.R., ALVES F.R., FRANCIOLLI A.L.R., FAVARON P.O., MARQUES F.L.N., CUYUMJIAN P.R., MIGLINO M.A., TOMMASI JR H.L.P., BUCHPIGUEL C.A., BOMBONATO P.P. Avaliação cintilográfica de diferentes dosagens de tecnécio-99m na padronização da perfusão pulmonar em cães da raça Rotteiller. **Ciência Rural**, v.40, p.554 - 560, 2010.

MATSUMOTO F., CARVALHO A.F., FRANCIOLLI A.L.R., FAVARON P.O., MIGLINO M.A., AMBROSIO C.E. Topografia e Morfologia das vísceras do Periquito Australiano (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.1263 - 1270, 2009.

RIBEIRO A.L.C., SEVERINO R.S., GUERRA R.R., FAVARON P.O., TOMMASI JUNIOR, H.L.P., RICI R.E.G., FRANCIOLLI A.L.R., FACCIOTTI P.R., BOMBONATO P.P. Biometria de pontes de miocárdio em muare (Equus caballus x Equus asinus - Linnaeus 1758). **Biotemas**, v.22, p.177 - 184, 2009.

TOQUETTI R.C., GUERRA R.R., AMBROSIO C.E., SANTOS J.M., FAVARON P.O., FRANCIOLLI A.L.R., ALBERTO M.V., MEIRELLES F.V., MIGLINO M.A. Morfologia e funcionalidade do pneumócito tipo II e sua relação e variação com a idade gestacional em bovinos. **Ciência Rural**, v.39, p.2470 - 2477, 2009.

FAVARON P.O., MANÇANARES C.A.F., DE CARVALHO A.F., AMBRÓSIO C.E., LEISER R., MIGLINO M.A. Gross and Microscopic Anatomy of the Pineal Gland in *Nasua nasua* - Coati (Linnaeus, 1766). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.37, p.464 - 468, 2008.

MORINI A.C., BARBOSA P.L.G., MELNIC R.V., MORINI JUNIOR J.C., FRANCIOLLI A.L.R., MARTINS D.S., PEREIRA F.T.V., FAVARON P.O., AMBRÓSIO C.E., MIGLINO M.A. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.437-445, 2008.

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