BRUNO GOMES VASCONCELOS

Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (*Cavia porcellus*)

São Paulo

2012

BRUNO GOMES VASCONCELOS

Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (*Cavia porcellus*)

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

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Maria Mess

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2659 FMVZ	<p>Vasconcelos, Bruno Gomes Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (<i>Cavia porcellus</i>) / Bruno Gomes Vasconcelos. -- 2012. 134 f., il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Andrea Maria Mess.</p> <p>1. Imunohistoquímica. 2. Marcação de proliferação. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. 4. Evolução. 5. Placentação. 6. Membranas fetais. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento da inversão do saco vitelino de Guinea pig (*Cavia porcellus*)", protocolado sob o nº 2521/2012, utilizando 18 (dezoito) guinea pig, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Development of the inverted yolk sac in the guinea pig (*Cavia porcellus*)", protocol number 2521/2012, utilizing 18 (eighteen) guinea pig, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VASCONCELOS, Bruno Gomes

Título: **Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (*Cavia porcellus*)**

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 **família** em especial,
ao meu pai, **Rui**, minha mãe, **Doralice**, e a minha irmã, **Laís**,
pela presença e apoio incontestável.
Por estarem sempre vibrando por mim em todos os momentos da minha vida.
Devo a vocês tudo que sou.
Eu amo vocês!*

*Ao meu avô **Nicolau dos Santos Lima** (in memoriam)
pelo exemplo de homem...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Maria Angelica**, por toda a oportunidade a mim oferecida nesse departamento. Acredito que lembrarei por toda a vida dos seus ensinamentos, broncas e “puxões de orelha” ao longo das disciplinas e reuniões. Gostaria que soubesse da sua intensa participação, não só da minha formação como professor, mostrando novos horizontes dentro da anatomia, mas também por ter feito de mim um homem melhor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, auxiliaram, não só na execução do projeto, mas nesta “nova” vida iniciada em outra cidade.

À força de **Deus** que conduziu os meus passos;

À **Profa. Dr. Andrea Mess** pela atenção, ajuda e orientação dedicada a este trabalho. Obrigado por dividir comigo este momento, acrescentando doutrinas sobre ciência;

Ao **Prof. Dr. Vicente Borelli** pela consideração e os sábios ensinamentos na anatomia. E, sobretudo, pelos aprendizados nas longas tardes e noites, montando aulas. Aprendi que uma aula é como um diamante que só tem um grande valor depois de serem lapidados os mínimos detalhes. Sem dúvida, um dos maiores exemplos de competência profissional;

Ao meu mestre **Prof. Dr. Frederico Ozanam** pela amizade. Por ter me ensinado a dar o primeiro passo na vida acadêmica, desde a iniciação científica. Por me ajudar a ver de outra forma os problemas do doutorado, sempre me influenciando a superá-los;

À **Dra. Claudia Marinovic** pela doação dos animais;

Ao **Dr. Peter Giere** pelo fornecimento do material histórico da Embryological Collection of the Museum of Natural History Berlin para análise da implantação embrionária;

Ao **Sr. Gaspar** pela ajuda no processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão;

Ao **Prof. Dr. Durvanei Maria** pela colaboração na criação dos animais, fornecendo o Biotério de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan;

À minha querida companheira, **Amanda**. Sem você ao meu lado acredito que nada disto seria possível. Você dividiu momentos bons, com muita risada, e difíceis, muitos destes problemas fizeram com que nossa união se tornasse cada vez mais forte. Sei que temos muitas histórias juntos e quero ter muito mais ao seu lado. Obrigado por tudo!

Ao meu grande amigo **Amilton**. Deixo aqui o meu reconhecimento pela nossa amizade e seu incentivo;

Aos amigos, **Phelipe, André e Diego**, pela imensa ajuda na realização dos experimentos e pela paciência ao me ensinar;

Ao casal, **Prof. Dr. Alan e a Dra. Rosângela**, pela amizade. Sempre dispostos a colaborar;

Aos colegas de trabalho: **Márcio, Rafael, Sarmento, Greyson, Sônia, Paula Fratini, Fernanda, Gustavo, Erika, Álvaro, Marina, Amanda Martins, Dayane, Juliana, Horácio, João Leonardo, Graciela, Isabella, Fabiele, Silvia, Paulo, Delys, Bruno Bertassoli, Daniela, Vitória, Thaís, Aline e Diego**;

Aos funcionários e técnicos de laboratório: **Maicon, Ednaldo, Jaqueline, Rose Eli, Diogo, Bernadete, Rosemeri, Augusto e Ronaldo**;

Aos secretários da pós-graduação: **Daura, Claudia e Henrique**. Obrigado por tudo, principalmente pelas longas conversas;

Aos técnicos do Biotério: **Júlio e Edson**. Pelos auxílios e orientações nos cuidados dos animais;

Aos bibliotecários: **Helena, Neusa, Gustavo e Elza**. Pela paciência e colaboração na formatação deste trabalho;

Aos demais professores: **Dr. Assis, Dr. Luis Claudio, Dr. José Roberto, Dra. Paula Papa** pelos aprendizados;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

A todos vocês serei eternamente grato!

“Problemas não são obstáculos, mas oportunidades ímpares de superação e evolução.”

Maurício R. de Moraes

RESUMO

VASCONCELOS, B. G. **Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (*Cavia porcellus*)**. [Development of the yolk sac in the guinea pig (*Cavia porcellus*)]. 2012. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O saco vitelino é uma estrutura única dos vertebrados que evoluiu uma grande diversidade de características de desenvolvimento, estrutural e funcional. É considerado de fundamental importância para a sobrevivência inicial do embrião. Apesar dos intensos estudos sobre a placentação no guinea pig, ainda existem lacunas importantes para a sua compreensão, no que se refere ao saco vitelino. Esta pesquisa visa detalhar a caracterização morfológica e do desenvolvimento do saco vitelino no *Cavia porcellus*. Dezesete amostras foram coletadas em idades gestacionais de 12 a 55 dias e investigadas mediante histologia convencional, histoquímica, imunohistoquímica incluindo o marcador de proliferação e microscopia eletrônica de transmissão. O material histórico da implantação embrionária foi utilizado da Embryological Collection of the Museum of Natural History Berlin, Germany. Foi observada a presença temporária do saco vitelino parietal e da cavidade do saco vitelino, durante a implantação do blastocisto. O saco vitelino, que recobre a placenta corioalantoica, mostrou uma grande diferença estrutural entre o 12º e 18º dia, como a transição do epitélio pseudoestratificado para projeções, que se assemelham a uma árvore. A membrana de Reichert não está desenvolvida no 12º dia, entretanto verifica-se um espaço preenchido de material extracelular e vacúolos. A membrana de Reichert foi encontrada a partir do 16º dia de gestação e com o desenvolvimento gestacional e se tornou cada vez mais espessa e constituída de material amorfo e acelular. Os dados morfológicos sugerem que a transferência de nutrientes do saco vitelino para o feto foi mais intensa entre o 22º e 40º dia, especialmente no 40º dia. No último terço da gestação, houve uma diminuição dos tecidos de ambos os sacos vitelinos –placentário e visceral–. Em conclusão, o desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig revela grande semelhança com os outros caviomorfos. Os dados sugerem que o saco vitelino nos caviomorfos é fundamental na gestação média, mas, não tanto, para os períodos iniciais da gestação, como é o caso dos outros vertebrados.

Palavras-chave: Imunohistoquímica. Marcação de proliferação. Microscopia eletrônica de transmissão. Evolução. Placentação. Membranas fetais.

ABSTRACT

VASCONCELOS, B. G. **Development of the yolk sac in the guinea pig (*Cavia porcellus*).** [Desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig (*Cavia porcellus*)]. 2012. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The yolk sac is a unique structure of vertebrates that evolved a great diversity of developmental, structural and functional features. It is regarded to have a fundamental role for early embryo survival. Although placentation has been intensely studied in the guinea pig, there are important gaps as in regard to the yolk sac. This research will undergo a detailed morphological and developmental characterization of the yolk sac in *Cavia porcellus*. Seventeen specimens have been collected at gestational ages from day 12 to 55 and investigated by conventional histology, histochemistry, immunohistochemistry including proliferation marker and transmission electron microscopy. Historical material on earlier stages was used from the Embryological Collection of the Museum of Natural History Berlin, Germany. A temporary parietal yolk sac and yolk sac cavity occurred during the blastocyst implantation. The yolk sac covering the chorioallantoic placenta showed great structural differentiation between day 12 and 18 such as a transition from a pseudostratified epithelium to projections that resemble a tree. A Reichert's membrane was not developed on day 12, but a space filled with extracellular material and vacuoles was present. The membrane was found from day 16 onward and became thick and composed of amorphous and acellular material. The morphological data suggest that a transfer of nutrients from the yolk sac to the fetus was most advanced between 22th and 40th day, especially on the 40th day. In the last third of gestation a decrease in both, placenta and visceral, yolk sacs tissues was observed. In conclusion, the development of the yolk sac in the guinea pig showed similarities to other caviomorphs. Data suggest that the yolk sac in caviomorphs is most important for mid gestation, but not so much for early pregnancy as it is for other vertebrates.

Keywords: Immunohistochemistry. Proliferation marker. Transmission electron microscopy. Evolution. Placentation. Fetal membranes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF –	Artéria fetal
AFV –	Anel fibrovascular
Cap –	Capilares
CE –	Célula endotelial
CEP –	Cone ectoplacentário
DE –	Disco embrionário
End –	Endoderma
Ent –	Endotélio
ESM –	Espaço sanguíneo materno
JIC –	Junções intercelulares
M –	Mórula
MB –	Membrana basal
MEC –	Material extracelular
Met –	Mesotélio
MR –	Membrana de Reichert
MV –	Microvilosidades
PCNA –	Proliferation cell nuclear antigen
Pla –	Placenta corioalantoica
P.A.S. –	Histoquímica com ácido periódico de Schiff
Proj –	Projeções citoplasmáticas
SV –	Saco vitelino
SVP –	Saco vitelino parietal
SVV –	Saco vitelino visceral
SVVI –	Saco vitelino visceral
SVVVo –	Saco vitelino visceral viloso
T –	Trofoectoderma
TC –	Tecido conjuntivo
Trof –	Trofoblasto
USP -	Universidade de São Paulo
Ute –	Útero
VeF –	Veia fetal

VF – Vaso fetal
VSV – Vilosidade do saco vitelino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias e fotomicroscopias elucidativas do material e métodos.....	53
Figura 2 - Fotomicroscopias do útero de <i>Cavia porcellus</i> , evidenciando a implantação embrionária, no 6º dia (A, B e C) e 7º dia (D) de gestação.....	59
Figura 3 - Fotomicroscopias do blastocisto, no 8º dia (A e B) e 9º dia (C e D) de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	60
Figura 4 - Fotomicroscopia (A) e eletromicrografias de transmissão referente à figura 4 A (B-F) do saco vitelino parietal, no 12º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	62
Figura 5 - Fotomicroscopias (A e B) e eletromicrografias de transmissão (C e D) referentes à figura 5 B do saco vitelino visceral, no 12º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	64
Figura 6 - Fotomicroscopias do saco vitelino visceral, no 14º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	65
Figura 7 - Fotomicroscopias do saco vitelino, no 16º dias de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	67
Figura 8 - Eletromicrografias de transmissão referentes às figura 8 C (A-C) e figura 8 D (D-F) do saco vitelino, no 16º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	69
Figura 9 - Fotomicroscopias do saco vitelino, no 18º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	71
Figura 10 - Fotomacroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 22º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	73
Figura 11 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral longe da placenta, no 22º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	75
Figura 12 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 10 B do saco vitelino parietal, no 22º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	77
Figura 13 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 11 A do saco vitelino visceral viloso, no 22º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	79
Figura 14 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 11 F do saco vitelino visceral, no 22º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	81
Figura 15 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos parietal, no 30º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	82

Figura 16 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral, no 30º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	83
Figura 17 - Fotomacroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 40º dias de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	85
Figura 18 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral, no 40º dias de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	87
Figura 19 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 17 C do saco vitelino parietal, no 40º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	88
Figura 20 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 18 A do saco vitelino visceral viloso, no 40º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	90
Figura 21 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 18 F do saco vitelino visceral, no 40º dia de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	92
Figura 22 - Fotomacroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 55º dias de gestação, de <i>Cavia porcellus</i>	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Importância do desenvolvimento no <i>Cavia porcellus</i> . São Paulo – 2012.....	101
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	JUSTIFICATIVA.....	22
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	GUINEA PIG E SUA IMPORTÂNCIA.....	26
3.2	EMBRIOLOGIA.....	27
3.3	O DESENVOLVIMENTO EVOLUCIONÁRIO DAS MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS.....	28
3.4	MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS.....	31
3.4.1	Âmnio e cório.....	31
3.4.2	Alantoide.....	33
3.5	RELAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO SACO VITELINO.....	34
3.5.1	Formação do saco vitelino em diferentes espécies.....	35
3.5.2	Aspectos macroscópicos e microscópicos do saco vitelino em diferentes espécies.....	38
3.5.3	Saco vitelino em roedores.....	39
3.5.4	Funções do saco vitelino.....	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1	OBTENÇÃO DO SACO VITELINO.....	51
4.1.1	Animais e amostras.....	51
4.1.2	Acasalamento.....	52
4.2	COLETA DO MATERIAL.....	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESTRUTURAS DO SACO VITELINO.....	55
4.3.1	Microscopia de luz.....	55
4.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	55
4.3.3	Imunolocalização da citoqueratina, vimentina e expressão do PCNA (proliferatin cell nuclear antigen).....	56

5	RESULTADOS.....	58
6	DISCUSSÃO.....	95
7	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICES.....	124

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Mamíferos placentários, incluindo os humanos, são caracterizados por uma placentação eficiente, com funções definidas que permitem a troca de nutrientes entre a mãe e o conceito (STARCK, 1975; MOSSMAN, 1987). Tal troca materno-fetal é principalmente facilitada pela placenta corioalantoica mas também pode ser suportada por outras estruturas, como o saco vitelino. O saco vitelino é uma estrutura única dos vertebrados que desenvolveu uma grande diversidade de característica de desenvolvimento, estrutural e funcional. Está entre as primeiras membranas extraembrionárias a se desenvolverem (MOSSMAN, 1987; MESS; CARTER, 2006; FERNER; MESS, 2011) sendo de fundamental importância na sobrevivência inicial do embrião. Em muitas espécies de mamíferos placentários, o saco vitelino é a principal fonte de nutrição entre a mãe e o feto na gestação inicial (MOSSMAN, 1987). Mesmo nos humanos, no qual o saco vitelino desaparece durante a ontogenia inicial, ele é de fundamental importância na hematopoiese inicial, no desenvolvimento de células sanguíneas e parte do sistema circulatório do embrião primitivo (WOLF et al., 2003).

Além disso, o saco vitelino também pode estar aposicionado sobre o epitélio uterino para estabelecer a placenta cório-vitelino. Essa última pode estar associada à inversão parcial ou completa da camada germinativa que leva a uma inversão do saco vitelino com a organização inversa das camadas (MESS; CARTER, 2006). A completa inversão do saco vitelino é particularmente conhecida no guinea pig e nos seus parentes roedores (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977). O *Cavia porcellus* representa um importante modelo animal em comparação ao humano (CARTER, 2007). Embora a espécie do guinea pig tenha sido intensamente estudada, existem lacunas importantes, principalmente na gestação inicial, para sua compreensão, muitas delas relacionadas ao saco vitelino da placenta. Para resolver algumas questões pendentes, o projeto irá detalhar uma caracterização do desenvolvimento do saco vitelino do guinea pig.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar dos intensos estudos sobre a placentação e a diferenciação do saco vitelino no guinea pig –descrito anteriormente– ainda existem lacunas importantes para a sua compreensão. Com o intuito de elucidar estas questões, a pesquisa passará por uma detalhada caracterização morfológica do desenvolvimento do saco vitelino no guinea pig. Em particular, abordaremos a diferenciação inicial do saco vitelino, a diferenciação e caracterização das partes vilosas e não-vilosas do saco vitelino invertido durante a gestação, assim como as partes que recobrem a placenta corioalantoica, o chamado saco vitelino parietal. Além da histologia convencional, a aplicação da imunohistoquímica e de marcador da proliferação, bem como a microscopia eletrônica de transmissão, especialmente nas gestações iniciais, serão usadas para entender melhor o estabelecimento e a função da placentação do saco vitelino nos caviomorfos.

É importante ressaltar que este trabalho respeitou os parâmetros Internacionais da Bioética e bem-estar animal, conforme preconiza a Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade da Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da USP sob o número 2521/2012.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O estudo foi realizar uma detalhada caracterização morfológica do desenvolvimento do saco vitelino no guinea pig, em especial no início da diferenciação e nas estruturas do saco vitelino, bem como as partes vilosas e não-vilosas do saco vitelino invertido e o saco vitelino parietal que recobre a placenta. Histologia convencional, histoquímica, imunohistoquímica e marcadores da proliferação como também a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados para caracterizar o estabelecimento e da placentação do saco vitelino nos roedores caviomorfos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – descrever a diferenciação macroscópica do saco vitelino do guinea pig incluindo o tamanho, estruturas gerais e vascularização;
- 2 – descrever a diferenciação estrutural com base na microscopia de luz;
- 3 – caracterizar ultraestruturalmente pela microscopia eletrônica de transmissão, especialmente durante a gestação inicial;
- 4 – caracterizar as imunolocalizações da citoqueratina e da vimentina durante a gestação;
- 5 – caracterizar a imunolocalização do PCNA (proliferation cell nuclear antigen) durante a gestação, a fim de identificar as fases e áreas do saco vitelino que apresentam maior ou menor proliferação celular;
- 6 – identificar, através dos dados morfológicos, o período que apresenta maior transferência de nutrientes do saco vitelino para o feto.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura foi sistematizada para facilitar a sua compreensão nos seguintes tópicos: 3.1 guinea pig e sua importância, 3.2 embriologia, 3.3 o desenvolvimento evolucionário das membranas extraembrionárias, 3.4 membranas extraembrionárias, 3.4.1 âmnio e cório, 3.4.2 alantoide, 3.5 relações morfofuncionais do saco vitelino, 3.5.1 formação do saco vitelino em diferentes espécies, 3.5.2 aspectos macroscópicos e microscópicos do saco vitelino em diferentes espécies, 3.5.3 saco vitelino em roedores e 3.5.4 funções do saco vitelino.

3.1 GUINEA PIG E SUA IMPORTÂNCIA

O guinea pig –membro dos roedores caviomorfos– é reconhecido como um importante modelo animal experimental, para vários aspectos em comparação à gestação humana (KAUFMANN, 2004; CARTER et al., 2006; CARTER, 2007). Em contraste com outras espécies, frequentemente utilizadas como os ratos, suínos e ovinos, o *Cavia porcellus* compartilha com os seres humanos tanto o tipo hemocorial da placenta, como o processo homólogo da invasão do trofoblasto (VERKESTE et al., 1998; KAUFMANN, 2004; ZAKI et al., 2005; CARTER et al., 2006; CARTER, 2007; MESS, 2007c). Entretanto, a placentação, em labirintos, em vez de vilosidades se torna muito complicada quanto à estrutura da lobulação da placenta que é composta por numerosos lobos de unidades circulatórias (KAUFMANN, 2004). Embora o guinea pig aparente, à primeira vista, ser diferente do humano, apresentando problemas semelhantes, acaba se tornando um candidato promissor, para o estudo dos efeitos dinâmicos do crescimento placentário (MESS, 2007b).

Carter (2007) comparou a gestação e placentação dos ratos com os humanos e encontrou algumas diferenças quanto à implantação, saco vitelino, invasão do trofoblasto e artérias uterinas, transformações das artérias uterinas, áreas de trocas placentárias, barreiras, trofoespôncio, hormônios placentários e gestação. Nos ratos, a implantação é secundariamente intersticial à inversão do saco vitelino, a invasão do trofoblasto das artérias uterinas é superficial e limitada proximalmente pela decídua. A transformação da artéria

uterina depende de fatores maternos (células “natural killer” uterinas), a área de troca placentária é em labirinto, a barreira para a troca é de três camadas de trofoblasto, outra de uma célula e interiormente duas do sincício, o trofoespongio é extenso, os hormônios placentários são lactogênicos e sua gestação dura três semanas. Já nos humanos, a implantação é primária, o saco vitelino flutua livremente pelo exoceloma durante o primeiro trimestre, a invasão do trofoblasto e das artérias uterinas depende do trofoblasto, a área de troca placentária é em forma vilosa, a barreira é composta por uma única camada de sincício trofoblasto, os trofoespongios estão ausentes, os hormônios placentários são a gonadotrofina coriônica, somatomatotropina coriônica e hormônios de crescimento placentário. Sua gestação dura nove meses.

O guinea pig é um dos roedores hystricognatas que não sofrem as taxas de mutação acelerada como acontece nos ratos e camundongos. Por isso, foi recomendado por Waddel, Kishino e Ota et al. (2001) como uma alternativa promissora para roedores murídeos. O genoma do guinea pig está próximo de ser concluído. Esta espécie separa-se de seus filhotes muito cedo. Assim como muitos eventos ocorrem durante o desenvolvimento fetal humano, também ocorrem durante a vida fetal do guinea pig. Este contraste com os roedores, que possuem uma gestação curta e separação ainda quando jovens, faz com que muitos desses processos ocorram durante o desenvolvimento pós-natal. Em contrapartida, o guinea pig ocupa mais espaço do que os ratos e tem um tempo mais longo de sua gestação (CARTER, 2007).

Além disso, a placentação do guinea pig é um modelo bem estabelecido para o estudo da transferência placentária (HILL; YOUNG, 1973; JANSSON; PERSSON, 1990) e da restrição do crescimento fetal (CARTER, 1993; KIND et al., 2005). A placenta humana é hemocorial (ENDERS, 1965), já os roedores hystricognatas possuem a subplacenta (RODRIGUES et al., 2006; MESS et al., 2007), uma estrutura de não-equivalência funcional com a dos humanos.

3.2 EMBRIOLOGIA

A embriologia é a parte da ciência que se ocupa dos embriões. O embrião, por sua vez, é o estado jovem do animal enquanto contido no ovo ou no corpo materno, e,

consequentemente, deixa de ser embrião quando se destaca do ovo ou quando nasce. Segundo Patten (1969), a embriologia é o estudo do crescimento e da diferenciação sofrida por um organismo no curso de seu desenvolvimento, desde o estágio de ovo até o de um ser altamente complexo, de vida independente e semelhante à de seus pais. Se tentarmos analisar o que se entende por desenvolvimento, veremos que estamos diante de uma ciência que engloba um conteúdo muito mais complexo, nos humanos (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

Esta área de estudo oferece a compreensão do desenvolvimento, estrutura, forma final e as relações dos tecidos e órgãos, possuindo assim informações relevantes para primórdios do desenvolvimento de diversas estruturas. Defeitos no desenvolvimento do embrião, dos animais domésticos, acarretam alterações nas condições clínicas, que podem ser melhor compreendidas através do conhecimento dos fatores que controlam esses processos de desenvolvimento, dos efeitos deletérios do ambiente nos teratógenos e no desenvolvimento embriológico normal (MCGEADY et al., 2006).

Para o entendimento da origem da vida é necessário saber que, para o desenvolvimento de um novo indivíduo ocorrer, há uma flutuabilidade que permite a maior liberdade de movimentos do conceito, além de condições térmicas, químicas e osmóticas relativamente constantes. Estas são adequadas às interações materno-fetais das muitas espécies. Para que isso ocorra, os vertebrados vivíparos desenvolveram membranas extraembrionárias que podem propiciar tais condições ao longo da evolução (BJÖRKMAN, 1982).

3.3 O DESENVOLVIMENTO EVOLUCIONÁRIO DAS MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS

A reprodução primitiva das fêmeas dos vertebrados inferiores é caracterizada pela descarga de um grande número de pequenos ovos em um ambiente aquático. Posteriormente há o lançamento do espermatozoide dos machos no mesmo local. A fertilização nessas circunstâncias é descrita como externa. Os envoltórios que suprem os requerimentos nutricionais para o desenvolvimento do zigoto, como o oxigênio, são obtidos pelo ambiente aquático e os seus restos metabólicos são descarregados no mesmo habitat aquático (MCGEADY et al., 2006). Em espécies que o embrião é dotado de uma limitação de

suprimento de nutrientes, o estágio intermediário larval possui característica de ser livre para se alimentar. Isso acarreta mudanças em seu desenvolvimento através da metamorfose, até o crescimento para a forma adulta. Portanto, a alta mortalidade associada ao tipo de reprodução é compensada pela grande quantidade de ovos produzida nessas circunstâncias (WOURMS, 2001).

Espécies que produzem uma pequena quantidade de ovos e possuem muito vitelo, na fase adolescente, estão em um estágio mais avançado do desenvolvimento ao emergir do ovo, tendo assim uma maior probabilidade de sobreviver (WOURMS, 2001). Nesse tipo de desenvolvimento que é comum de se encontrar em peixes cartilaginosos, alguns peixes ósseos, répteis, aves e mamíferos, o estágio larval não ocorre (AMOROSO, 1952; MOSSMAN, 1987; BLACKBURN, 1993; MCGEADY et al., 2006).

Em estágios mais avançados no desenvolvimento evolucionário, as fêmeas produzem ovos que ficam mantidos em seu corpo. O macho deposita espermatozoide dentro do aparelho reprodutor feminino e a fertilização ocorre internamente. Nessas espécies o conteúdo vitelino dos ovos é relativamente baixo e o embrião recebe os requerimentos nutricionais e de oxigênio através do sistema vascular materno. Esse padrão de reprodução é encontrado na maioria das espécies de vertebrados, com exceção das aves. Essas espécies em que o embrião é desenvolvido e mantido dentro do corpo da fêmea do qual os filhotes nascem, são denominados de vivíparos (WOURMS; GROVE; LOMBARDI, 1988). Esses animais apresentam intensa vascularização do saco vitelino e o alantoide, com atenção especial ao cório que é muito importante na evolução da placentação de vários vivíparos amniotas (FERNER; MESS, 2011).

Já o termo ovíparo é usado nas espécies em que os embriões eclodem de ovos incubados fora do corpo, apresentam uma membrana corioalantoica que apresenta maior troca de gases respiratórios entre o feto e o meio (FERNER; MESS, 2011). Apresenta um número de espécies que possui um nível de desenvolvimento intermediário entre ovíparos e vivíparos. Esses recebem o nome de ovovivíparos, isto é ovos que são sobrecarregados de vitelo e são retidos pelo corpo da mãe, sendo que o embrião recebe os requerimentos nutricionais do próprio ovo e suas necessidades respiratórias são fornecidas através do sistema vascular materno (MCGEADY et al., 2006).

A evolução e a estabilização das membranas fetais, como o âmnio, o alantoide e o cório, fechadas em uma casca de ovo calcificada, permitiu que os vertebrados vivessem e reproduzissem independentemente do meio aquático e as mesmas levam a sucessivas

evoluções nos vertebrados terrestres (STARCK, 1975; MOSSMAN, 1987; BLACKBURN, 1993; MESS; BLACKBURN; ZELLER, 2003; WESTHEIDE; RIEGER, 2010).

Os embriões que se desenvolvem no meio aquático confiam em seus ovos como fonte de alimento em sua própria oferta. O requerimento de oxigênio ocorre através da água e os seus resíduos metabólicos difundem em torno de seu ambiente aquático. O armazenamento do vitelo pode ser no interior da face ventral das células do endoderma localizado na parede do intestino. Nos anfíbios se localizam na face medial dos seus ovos, ou na forma extracelular da massa ventral do desenvolvimento do embrião nos peixes, répteis e aves que possuem uma grande quantidade de vitelo nos ovos (MCGEADY et al., 2006). Em embriões que desenvolvem grande quantidade de vitelo nos ovos, a parede do corpo do embrião cresce ao lado da massa vitelínica, formando um saco trilaminar –o saco vitelínico–. O mesoderma do saco vitelínico trilaminar tornou-se vascularizado e os nutrientes permanecem fechados e são absorvidos por via da camada endodérmica, depois transportados por vasos vitelínicos até o embrião (BLACKBURN, 1993).

A evolução dos vertebrados terrestres necessitou de mudanças, no desenvolvimento do embrião, que permitisse a sobrevivência em ambientes não aquáticos, através da evolução das membranas fetais. A partir de um repertório basicamente similar, as membranas fetais, o âmnio, cório, alantoide e o saco vitelino formam o ovo cleidóico, no qual apresentam diferentes estruturas e soluções, para o desenvolvimento e a evolução do embrião (AMOROSO, 1952; MOSSMAN, 1987; MESS; BLACKBURN; ZELLER, 2003; FERNER; MESS, 2011).

Entretanto algumas espécies, como os anfíbios, evoluíram para um ambiente terrestre, porém retornam ao ambiente aquático para postura. Já em outras espécies, como as tartarugas, realizam a postura em ambientes terrestres, porém úmidos. Aves e répteis se adaptaram a ambientes não aquáticos através de ovo com cascas ou membranas protetoras secretadas pelo próprio aparelho reprodutivo. Adicionalmente, o albúmen é secretado pelo aparelho reprodutivo das fêmeas como uma fonte adicional de nutriente e é colocado em um reservatório. Espécies terrestres também são envolvidas adicionalmente por membranas extraembrionárias, o âmnio, o cório e o alantoide, conferindo maior proteção, conservação de água e armazenamento de resíduos (MCGEADY et al., 2006). Nos mamíferos, há uma tendência para a redução das membranas entre o sistema sanguíneo, a fim de facilitar o processo de troca de gases entre os meios (WOODING; FLINT, 1994; FERNER; MESS, 2011).

3.4 MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS

Estruturas ou tecidos que se desenvolvem do zigoto e que não fazem parte do próprio embrião são chamadas de membranas extraembrionárias. Suas funções estão concentradas no suprimento ou no armazenamento de nutrientes, trocas respiratórias, excreção e mecanismos de proteção do embrião. Essas estruturas também estão associadas à transferência de imunoglobulina da mãe para o embrião, conferindo a imunidade passiva (MOSSMAN, 1987). Nos mamíferos, além das funções supracitadas, as membranas extraembrionárias estão envolvidas na produção de hormônio e na formação da placenta. E como as membranas são unicamente necessárias para o desenvolvimento do embrião, são rompidas ou absorvidas com a eclosão do ovo ou ao nascimento (BLACKBURN, 1993; MCGEADY et al., 2006).

Com exceção do trofoectoderma –componente do cório– as membranas extraembrionárias dos conceptos dos vertebrados estão sob a forma de três camadas germinativas contínuas –ectoderma, mesoderma e o endoderma– do embrião. O termo “extra” é utilizado no sentido de “fora do”. Essas membranas fornecem a formação básica das estruturas essenciais da placenta que são responsáveis pela manutenção fisiológica e proteção dos embriões, tanto no útero como no ovo (MOSSMAN, 1937; STEVEN, 1975; MOSSMAN, 1987).

As membranas constituintes dos anexos embrionários, apenas a parte dorsal do saco vitelino é incorporada na formação do corpo do embrião, formando o revestimento epitelial do intestino, enquanto o alantoide está relacionado com a formação da bexiga e do úraco (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

3.4.1 Âmnio e cório

Como o âmnio e o cório são intensamente associados em suas origens, eles podem ser usualmente considerados juntos. Nos mamíferos domésticos e nas aves, ambas as membranas são formadas pela prega dorsal da membrana extraembrionária. Com a ruptura da zona

pelúcida durante a segunda semana de desenvolvimento, o blastocisto deixa de ser confinado e passa a ter mais espaço, permitindo seu alongamento e pode atingir um comprimento de 60-100 cm em bovinos, ovinos e suínos. O seu disco embrionário é minimamente afetado pelo processo de alongamento, o qual envolve o trofoblasto e, em menor medida, o revestimento interno do endoderma. Logo após o aparecimento da linha primitiva, o trofoblasto forma pregas em torno do disco embrionário. Com o crescimento da cabeça e da cauda do embrião acaba empurrando para mais fundo o trofoblasto, que passa a ser revestido por uma camada de mesoderma somático, formando a somatopleura extraembrionária. As dobras são conhecidas como pregas amnióticas ou córioamnióticas (MCGEADY et al., 2006). A prega amniótica estende centripetamente acima do embrião onde eles se encontram e se fundem. Mais tarde, a camada externa da somatopleura separa-se da camada interna, deixando o embrião rodeado por duas membranas, a membrana interna da somatopleura, que permanece aderida ao embrião através do umbigo, e forma com o âmnio a outra membrana da somatopleura, que envolve completamente o embrião, o âmnio e o saco vitelino –o cório-. As pregas amnióticas se fundem em forma de cordão –rafe córioamniótico– que está presente por um curto tempo e depois se rompe, resultando na separação completa entre o âmnio e o cório. O espaço entre o âmnio e cório é o celoma extraembrionário (STARCK, 1975; MOSSMAN, 1987).

Vale ressaltar que o cório desenvolve-se primeiro de uma simples camada de células do epitélio trofoblástico, que é avascular (BJÖRKMAN et al, 1989).

No estágio do trofoectoderma e da massa celular interna, a qual irá formar o embrião, essas duas estruturas se encontram separadas e não estão entre a conversão da linhagem de células. Por exemplo, no rato o gene *Cdx2* é expressado predominantemente no trofoblasto e o *Oct3/4* somente na massa celular interna (SELWOOD; JOHNSON, 2006). Muitos animais, como os esquilos, os ruminantes e os carnívoros, perdem as células do trofoectoderma, sob o polo da massa celular interna no caso do cório (trofoectoderma mais o mesoderma não vascular) e produz pregas que envolvem o embrião para formar líquido e saco amnióticos. Dentro do embrião pode-se desenvolver livremente sem assimetria, em um ambiente de choque-absorção e compreensão-resistente. A membrana amniótica é derivada diretamente do cório. Nos animais onde o trofoectoderma persiste sobre a massa celular interna, a forma da cavidade amniótica e o tecido dentro da massa celular interna (WOODING; BURTON, 2008).

Já o âmnio forma uma bolsa acima do disco embrionário, cujo assoalho é a própria ectoderme embrionária, e esta, por sua vez, é formada por um epitélio pavimentoso simples,

sendo revestida externamente pelo mesoderma extraembrionário. Esse mesmo mesoderma forma um pedículo de conexão entre a bolsa amniótica e o cório, que futuramente constituirá parte do cordão umbilical (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

O âmnio é fino, porém resistente e forma a parede de um saco repleto de líquido, no qual o embrião se desenvolve (MCGEADY et al., 2006). Björkman et al. (1989) acrescenta que o âmnio é formado sobre uma membrana avascular de tecido conjuntivo do ectoderma e são várias as funções do líquido, ressaltando-se principalmente a lubrificação do embrião, o impedimento da aderência de tecidos fetais entre si e com as paredes do saco coriônico, a lubrificação que facilita os movimentos fetais e o final da gestação funciona também como amortecedor de choques (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

A formação de dobras do âmnio ocorre em aves, répteis e nos mamíferos domésticos, que é considerado a mais primitiva forma da amniogênese. Nos primatas superiores e humanos, a forma do âmnio é gerada por um processo de cavitação da massa celular interna que é considerada o meio mais especializado, para a forma da amniogênese. O método da formação do âmnio possui influência do tipo da implantação: no início estão associadas à cavitação da amniogênese e tardias à formação das dobras do âmnio (MCGEADY et al., 2006).

3.4.2 Alantoide

O alantoide, já difere das membranas anteriores conforme a sua origem, que é endodérmica e, é vascularizado (BJÖRKMAN et al., 1989). Nos animais domésticos, o alantoide se desenvolve como divertículo da esplancnopleura e cresce dentro celoma extraembrionário. Nos bovinos, ovinos e suínos, o divertículo está em forma de âncora; nos carnívoros, felinos e equinos, a estrutura apresenta-se em forma de tubo e, com o desenvolvimento completo, encontra-se entre o âmnio e cório. A vascularização do mesoderma do alantoide, quando fundida do cório, forma a vascularização da membrana córioalantoide. A área de contato entre a membrana citada anteriormente e o endométrio, forma a placenta corioalantoica. O volume do fluído do saco do alantoide aumenta gradativamente durante o primeiro e, ao trigésimo dia de gestação, depois aumenta rapidamente de volume (MCGEADY et al., 2006).

A função primária do alantoide é a vascularização do cório de forma que a placenta corioalantoica fornece nutrientes e a via respiratória para trocas do embrião. O alantoide também funciona como extensão da bexiga, facilitando o armazenamento de resíduos urinários (STARCK, 1975; MOSSMAN, 1987; BLACKBURN, 1993). Nos homens e nos primatas superiores, o alantoide é estreito, semelhante a um tubo da esplancnopleura que cresce na haste da conexão do corpo, conectando-o, porém não há presença de líquido (MCGEADY et al., 2006).

O alantoide é a continuidade do desenvolvimento do sistema urogenital do embrião e atua como um local, para o armazenamento de resíduos. Possui um rico suprimento sanguíneo que permite realizar troca respiratória, quando o crescimento do exoceloma se funde com o cório, em volta do embrião. Nas espécies com um sólido crescimento fora do alantoide da endoderme, como nos ratos, guinea pig e humanos, os resíduos são removidos continuamente pela placenta (WOODING; BURTON, 2008).

3.5 RELAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO SACO VITELINO

Em todos os eutérios, o período gestacional divide-se em duas fases: a embrionária e a fetal. O estágio mais crítico, para a sobrevivência do concepto, ocorre na fase embrionária, que depende de uma forte e harmoniosa interrelação entre o embrião e o saco vitelino (RIVEROS et al., 2010).

O papel dominante do saco vitelino, tanto no desenvolvimento como na evolução das membranas fetais dos vertebrados, é a razão principal do seu uso como o maior indicador das relações filogenéticas entre os eutérios (MOSSMAN, 1987). Atualmente, não se tem dúvida de que o saco vitelino desempenha um papel fundamental durante a fase inicial da gestação (NOGALES; BELTRAN; GONZÁLEX, 1993), com função trófica para a sobrevivência do embrião (FUKUDA, 1973). É um grave erro propor que esta estrutura seja apenas um órgão vestigial e sem importância funcional. Além disso, alterações na morfogênese do saco vitelino repercutem diretamente no desenvolvimento normal das funções vitais do embrião (RIVEROS et al., 2010).

3.5.1 Formação do saco vitelino em diferentes espécies

A maioria das espécies animais apresenta particularidades específicas durante o desenvolvimento embrionário. Porém, todas desenvolvem uma sequência básica bastante semelhante: segmentação ou clivagem, gastrulação, neurulação e organogênese (NODEN; LAHUNTA, 1990; GARCIA; FERNANDEZ, 2001). Os movimentos morfogenéticos das células do disco embrionário só são possíveis graças ao saco vitelino e à cavidade amniótica (SADLER, 2005).

A formação do saco vitelino inicia-se quando o hipoblasto (endoderma prospectivo) sofre deslocamento e delamina-se, dando origem à cavidade de blástula. O mesoderma, formado no botão embrionário primitivo, migra entre o epiblasto e o hipoblasto (MOSSMAN, 1937; JUNQUEIRA; ZAGO, 1982). Este transforma a blástula em uma estrutura de três camadas. O epiblasto é transformado no trofoblasto do cório. A cavidade, forrada pelo endoderma, é o saco vitelino, área que circunda o vitelo. Este completa seu desenvolvimento no momento em que a porção extraembrionária de celoma se alarga. Assim, o saco vitelino é uma esplancopleura, que inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica. Constituído por células originadas a partir do disco embrionário, ele forma inicialmente uma camada fina de ectoderma (saco vitelino unilaminar ou onfalopleura). Subsequente a migração de células das camadas internas, do endoderma para o ectoderma, forma o saco vitelino bilaminar e, finalmente, o crescimento do mesoderma, entre os dois primeiros, dão origem ao saco vitelino trilaminar (MOSSMAN, 1937; WOODING; BURTON, 2008). Caso não esteja presente o vitelo, há o desenvolvimento das duas últimas camadas da mesma forma que gera um blastocisto unilaminar, que produz a partir de uma esfera sólida de células –a mórula– (WOODING; BURTON, 2008).

Nos peixes e nos anfíbios, o mesoderma do saco vitelino trilaminar forma vasos sanguíneos que vascularizam esta estrutura e transportam conteúdo para o crescimento do embrião. Esta irrigação do saco vitelino persiste em alguns peixes após a liberação do embrião para a formação do ovo. A retenção do desenvolvimento do embrião dentro da mãe permite a possibilidade de modificar a vascularização do saco vitelino, para direcionar a troca materno-fetal. Vários peixes cartilaginosos (elasmobrânquios–raias) desenvolveram este tipo de sistema placentário enquanto que os peixes ósseos (osteítes) e os anfíbios modificaram outras partes de sua superfície corporal, para o mesmo fim (WOODING; BURTON, 2008).

Nos répteis e mamíferos, a propagação inicial do mesoderma converte somente a parte superior do saco vitelino bilaminar dentro da forma trilaminar vascular. Isso é baseado pelo desenvolvimento de outras membranas extraembrionárias do tipo amniótica: cório, âmnio e alantoide (WOODING; BURTON, 2008).

Durante a fase inicial de alongamento do saco vitelino, o endoderma diferencia-se, na região da membrana citoplasmática, em células prismáticas e células achatadas, as quais acompanham o trofoblasto (RÜSSE et al., 1992).

O saco vitelino é o primeiro anexo a ser formado, por uma camada do epitélio endodérmico, acompanhado pelo mesênquima fetal vascularizado (vasos vitelínicos). As aves têm a função de conter o vitelo, desintegrá-lo, absorver substâncias nutritivas e levá-las para o embrião, mediante vasos vitelínicos (ZAGO; COVAS, 2006).

Nos humanos, por volta do sétimo dia de desenvolvimento embrionário, a massa celular interna do blastocisto se organiza em duas camadas celulares, passando a ser constituído por um disco bilaminar que é formado por epiblasto e hipoblasto. Paralelamente o trofoblasto também se diferencia em duas camadas, a mais externa é a que está em contato direto com a mucosa uterina, chamada de sinciotrofoblasto, e uma camada interna denominada citotrofoblasto (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982).

Entre o citotrofoblasto e o epiblasto aparecem pequenos espaços que se confluem, formando uma cavidade única –a cavidade amniótica–. No nono dia de gestação do humano, a partir da face interna do citotrofoblasto, células achatadas, oriundas do hipoblasto, se dispõem de modo a constituir a membrana de Hauser, bastante delgada. A cavidade do blastocisto, que agora não mantém contato com o citotrofoblasto porque está forrada pela membrana de Hauser, é conhecida como saco vitelino primitivo ou cavidade exocelômica (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; SADLER, 2005).

Segundo Sadler (2005) nos humanos, no 9º dia da gestação, o polo embrionário desprende-se da fase interna do trofoblasto, uma camada de células achatadas (membrana de Hauser). Esta membrana, junto com a margem do disco embrionário, forram a cavidade exocelômica ou saco vitelino primitivo.

Ao longo de toda a superfície interna do citotrofoblasto, destacam-se células que constituirão o mesoderma extraembrionário, revestindo inteiramente o âmnio e o saco vitelino primitivo (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982).

Por volta do 12º dia de idade do blastocisto humano, as células endodérmicas começam a revestir internamente a membrana de Hauser, formando a cavidade, denominada

saco vitelino secundário ou definitivo (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Este novo saco é menor e localiza-se entre o âmnio e o cório, na cavidade celômica extraembrionária. Permanece unido ao embrião pelo pedículo vitelino através da alça intestinal média (PEREDA; CERISOLA; POZO, 1988; SADLER, 2005) ficando aberto para cavidade vitelina (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

O saco vitelino, em humanos, é um órgão flutuante na cavidade exocelômica, entre a placenta e a cavidade amniótica, participando do desenvolvimento do embrião. Está, durante a 6ª semana de gestação, como uma estrutura esférica e cística, coberta por numerosos vasos superficiais pequenos, os quais se fundem na base do ducto vitelino e liga o saco vitelino à parte ventral do embrião, diretamente ao intestino e à principal circulação sanguínea (GONZALES-CRUSSI; ROTH, 1976; JONES; JAUNIAUX, 1995).

O intestino médio gradativamente vai sendo fechado e, durante o processo de dobramento do embrião, o saco amniótico empurra o saco vitelino, ficando este preso ao corpo do embrião por um fino pedículo vitelino. O saco vitelino, nos mamíferos, persiste apenas como uma estrutura rudimentar, bem como o pedículo alantoico, mais caudal que o primeiro, ficará incorporado pelo cordão umbilical (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

Conforme afirma Hafez e Hafez (2004) em animais domésticos, a lâmina mesodérmica se divide e combina com o trofoectoderma, para formar o saco vitelino. Nos ruminantes, o saco vitelino é grande e vascular. Portanto, é completamente cercada pela cavidade extraembrionária, soltando-se do cório pelo 20º dia de gestação na vaca. Como resultado, próximo ao 25º dia, o saco vitelino foi reduzido a uma estrutura sólida como um cordão (LATSHAW, 1987).

Barone (1976) afirma que o saco vitelino sofre involução e se degenera muito cedo nos ruminantes e, a partir da segunda semana, seus vestígios não são encontrados até o final da gestação.

Na ratazana, o saco vitelino é o principal órgão nutritivo do embrião antes da formação da placenta alantóica funcionante. No camundongo, o saco vitelino é desenvolvido e similar ao da ratazana, envolvendo completamente o âmnio durante a maior parte da gestação (RENFREE; HENSLEIGH; MCLAREN, 1975). Já no macaco rhesus (*Macaca mulatta*), o saco vitelino degenera rapidamente e possivelmente não chega a ser funcional (NODEN; LAHUNTA, 1990).

3.5.2 Aspectos macroscópicos e microscópicos do saco vitelino em diferentes espécies

Morfologicamente a parede do saco vitelino está constituída por três camadas sobrepostas: um epitélio de revestimento endodérmico interno, um epitélio de revestimento externo que corresponde ao mesotélio em contato direto com o exoceloma e um tecido mesenquimal entre ambas as superfícies, que contém vasos sanguíneos, tecido hematopoético e macrófagos (PEREDA; CERISOLA; POZO, 1988; PEREDA; MOTTA, 1999; TAPIOL, 2001).

Nos ruminantes o saco vitelino é grande, vascular e completamente cercado pela cavidade extraembrionária. Ele solta-se do cório pelo 20º dia de gestação e reduz-se a uma estrutura sólida como um cordão, ao redor dos 25º dia (LATSHAW, 1987). Assis Neto et al. (2010) descrevem que em embriões bovinos o saco vitelino se desenvolve até o dia 30 de gestação e torna-se macroscopicamente visível até o dia 50 de gestação.

Riveros (2009) observa diferenças morfológicas do saco vitelino no início do desenvolvimento, fase de atividade vitelina e fase de degeneração da membrana ainda em idade embrionária, na espécie bovina. Aos 24 dias de desenvolvimento embrionário, o saco vitelino apresentou alças alongadas em formato de “T” a qual esteve conectada à membrana córioalantoide através do pedículo embrionário, já aos 37 dias, o saco vitelino encontra-se vascularizado, justaposto ao âmnio e ao cordão umbilical de onde parte toda a vascularização da membrana córioalantoide.

Em humanos, o saco vitelino surge na sexta semana gestacional como uma estrutura esférica e cística, sendo coberto por numerosos vasos superficiais pequenos, os quais se fundem na base do ducto vitelino ligando o saco vitelino à parte ventral do embrião, diretamente ao intestino médio e à principal circulação sanguínea (GONZALES-CRUSSI; ROTH, 1976; JONES; JAUNIAUX, 1995).

Em animais domésticos, o saco vitelino inicia sua regressão por volta da segunda ou terceira semana gestacional, à medida em que o alantoide se expande para se fundir com o cório (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MIGLINO et al., 2006). Na maioria das espécies mamíferas, o saco vitelino é ativo apenas durante o período embrionário e involui no período fetal.

É descrito, ainda, que a involução do saco vitelino nos ruminantes começa periféricamente nos extremos e avança centripetamente (RÜSSE et al., 1992), sendo que a partir da segunda semana gestacional, seus vestígios não são mais encontrados (BARONE,

1976). Entretanto, a função do saco vitelino é estendida na placenta esférica da égua, enquanto o alantoide se expande gradualmente para substituí-lo no 30º dia de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na maioria dos roedores o saco vitelino sofre um processo de inversão junto à placenta principal, formando a placenta vitelínica. O saco vitelino da paca (*Cuniculus paca*) e da cutia (*Dasyprocta aguti*) é invertido e vascularizado (CONCEIÇÃO et al., 2008).

3.5.3 Saco vitelino em roedores

Inúmeros autores, Bischoff (1852); Hensen (1876, 1863); Herrmann e Stolper (1904, 1905); Disse (1905) e Amoroso (1952), informaram que o oócito fertilizado implanta no útero, no estágio de mórula ou blastocisto, entre o 4º e 5º dia no guinea pig. Enders e Schlafke (1969) comentaram que a transição da fase de não-implantação para a fase aposicional ocorreu após a ligação do blastocisto à parede do útero. No entanto, Kaufmann e Davidoff (1977) observaram que a implantação ocorreu entre o 6º e 7º dia. No *Galea spixii*, Oliveira et al. (2012b) descreveram que a implantação resultou no embrioblasto e no trofoectoderma, no 6º dia.

Em *Thrichomys laurentinus*, Oliveira et al. (2012a) relataram que, na implantação inicial, o cone ectoplacentário esteve profundamente em contato próximo com o útero e o tecido materno, e que o embrioblasto está oposto ao cone ectoplacentário. A parte extraembrionária está constituída por uma camada externa do trofoblasto e interna de mesênquima. Acrescentaram, ainda, que o tecido fetal foi invasivo, as artérias espirais não são afetadas pela invasão do trofoblasto e que possuem endotélio intacto através da marcação da vimentina.

Em *Galea spixii* (OLIVEIRA et al., 2012b) no 10º dia e em *Cavia porcellus* (REICHERT, 1862; SPEE, 1883; SELENKA, 1884; DUVAL, 1890; LUCKETT, 1985) verificaram-se, no estágio inicial, que as células do hipoblasto são precursoras do saco vitelino visceral, e a do cone ectoplacentário da placenta. Kaufmann e Davidoff (1977) informaram que, no 8º dia, há o começo da diferenciação das camadas de células que estão voltadas à cavidade do blastocisto com o início do endoderma, levando somente à formação do saco vitelino visceral, e conseqüentemente, à não existência da cavidade do saco vitelino

em nenhum estágio do desenvolvimento. No 9º dia, o mesoblasto extraembrionário localizou-se entre o embrioblasto e o saco vitelino visceral, e continua o seu crescimento até que ambos sejam completamente separados; no 9º dia e meio, o mesoderma cresceu para fora da zona marginal, entre o saco amniótico e o saco vitelino, para o cone ectoplacentário. Mess (comunicação pessoal) acrescentou que o saco vitelino parietal desaparece no 11º dia, sem afetar o desenvolvimento do saco vitelino visceral em direção ao disco embrionário. Dessa forma, leva ao desaparecimento consequente da cavidade do saco vitelino. Kaufmann e Davidoff (1977) informaram, no 12º dia, que o endoderma intestinal se destaca do epitélio do saco vitelino.

Oliveira et al. (2012b) em *Galea spixii* observaram que o saco vitelino parietal está temporariamente presente entre o 12º-13º dia, com as identificações dos endodermas dos sacos vitelinos visceral e parietal, voltados um para outro, formando uma cavidade do saco vitelino –indicativo do seu crescimento–. Porém, a camada externa precursora do saco vitelino parietal desaparece imediatamente, sem afetar a posição do saco vitelino visceral. Em adição, os autores sugerem que seja necessária uma mudança da nomenclatura em relação ao saco vitelino parietal, pois, na gestação inicial, esse termo refere-se ao saco vitelino longe da placenta e não o saco vitelino que recobre a placenta. Assim se propõem a denominação de saco vitelino da placenta ou placentário.

No *Galea spixii*, observou-se que a completa inversão do saco vitelino, a exposição do endoderma visceral ao útero, ocorreu no 14º dia de gestação. Ainda nessa data, Oliveira et al. (2012b) acrescentaram que o saco vitelino visceral, que recobre a placenta corioalantoica acima da membrana de Reichert, apresenta um epitélio colunar alto com pseudoestratificação, com todas as áreas do saco vitelino, apresentando proliferação.

No 15º dia de gestação do guinea pig, Kaufmann e Davidoff (1977) descreveram a fusão do epitélio do saco vitelino com a placenta, que formou uma superfície cada vez mais extensa, voltada à face fetal da placenta. Essa considerável extensão do saco vitelino parietal sobre o saco vitelino visceral levou a uma intensa formação de vilosidades próxima à margem placentária; no 17º dia houve o crescimento dessas vilosidades.

Perrotta (1959) informou que, no *Erethizon dorsatum*, a inversão completa das camadas germinativas mesmo durante os primeiros estágios. O endoderma, derivado do segmento distal da onfalopleura bilaminar, mostra que a origem do saco vitelino é avascular. No entanto, o endoderma proximal está em contato com os vasos sanguíneos vitelínicos da esplancnopleura. Primeiramente, a placentação, os vilos e a inversão do saco vitelino são

visualizados próximos à placenta. O autor acrescenta que o epitélio uterino está estreitamente ligado ao saco vitelino invertido.

No 15º dia do guinea pig, Carter et al. (1998) verificaram, através de estudos imunohistoquímicos, o endoderma do saco vitelino parietal, marcado positivamente pela citoqueratina. É contínuo com o endoderma visceral que apresenta uma camada externa voltada à cavidade decidual e à interna do mesoderma, na qual a primeira camada é reativa à citoqueratina e à última tanto pela citoqueratina como pela vimentina. Macroscopicamente, Duval (1892) informou que a vascularização do saco vitelino visceral não está completa até o 19º dia.

Na gestação muito inicial, em *Dasyprocta leporina*, o saco vitelino visceral liga-se à superfície fetal da placenta corioalantoica, revestindo-a apenas por uma camada de saco vitelino. O saco vitelino viloso está em íntima relação com a placenta corioalantoica. O endoderma do saco vitelino é plano e composto por células colunares, situadas adjacentes ao lúmen do epitélio endometrial devido à completa inversão. Tanto em *D. leporina* como em *G. spixii* o mesoderma é inicialmente suprido pelos vasos fetais e o sistema do anel fibrovascular ocorre adjacente à placenta (MIGLINO et al., 2008).

Em *Thrichomys laurentinus*, Oliveira et al. (2012a) relataram, em estágio inicial, que, próximo à placenta, o saco vitelino é extremamente viloso e distante da placenta há presença de moderadas estruturas vilosas. O endoderma dessas regiões –vilosa e não vilosas– foi ativo à proliferação celular. Ultraestruturalmente, ambos os sacos vitelinos –próximo e distante à placenta– contém projeções apicais no endoderma e várias inclusões, tais como gotículas lipídicas, multivesículas e estruturas, revestidas perto da superfície das células, que indicam captação de substâncias. Largos espaços intercelulares são observados entre as células do endoderma.

Na viscacha (*Lagostomus maximus*), Flamini et al. (2011) informaram que, na gestação inicial (de 40 a 60 dias), a placenta corioalantoica foi recoberta pelo saco vitelino parietal sem vilosidades sobre uma membrana de Reichert bem desenvolvida com a presença de células. Essas células continham microvilosidades e foram interconectadas por fortes junções na base. O saco vitelino visceral está presente em toda gestação e apresenta completa inversão, com grandes vilos e razoável vascularização.

No *Octodon degus*, Mess (2007a) observou, na gestação inicial, a margem da placenta voltada para a face fetal, sendo recoberta pelo saco vitelino parietal. Primeiramente por uma camada de células no início da gestação –no 26º dia– e posteriormente –31º dia– através de

várias camadas ou pseudoestratificação. Em adição, a passagem de uma camada para múltiplas camadas, ou pseudoestratificação, foi verificada no guinea pig (KAUFMANN, 1969, 1981, 2004; DAVIDOFF; SCHIEBLER, 1970; KING, 1971; KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977; CARTER et al. 1998), capivara (MIGLINO et al., 2002), paca (BONATELLI et al., 2005), mocó (OLIVEIRA et al., 2006), chinchila (TIBBITTS; HILLEMANN, 1959; KING; TIBBITTS, 1976), *Thryonomys swinderianus* (ODUOR-OKELO; GOMBE, 1982; ODUOR-OKELO, 1984), *Heterocephalus glaber* (LUCKETT; MOSSMAN, 1981), *Octodon degus* e no *Petromus typicus* (MESS, 2007c), porco-espinho (LUCKETT; MOSSMAN, 1981) e *Myocaster coypus* (HILLEMANN; GAYNOR, 1961).

Na gestação inicial, em *Dasyprocta leporina*, Miglino et al. (2008) relataram que o saco vitelino é ainda mais liso e plenamente suprido por vasos fetais. Visualiza-se a proliferação das células endodérmicas e da base das vilosidades; com ativa secreção do endoderma, que foi comprovado pela histoquímica com ácido periódico de Schiff (P.A.S.). As áreas do saco vitelino, que recobrem a placenta e distantes a ela, associadas ao útero, apresentaram, no ápice das células, pequenos vacúolos, grânulos e partículas elétricas densas sugestivas de ativa secreção e provável endocitose. Grandes vacúolos são indicativos de uma grande absorção de substâncias, como foi demonstrado no guinea pig (LEISSRING; ANDERSON, 1961; KING; ENDERS, 1970b).

Em *Cuniculus paca*, Miglino et al. (2008) relataram que, na gestação inicial, o saco vitelino visceral é invertido e extremamente plano e suprido por vasos fetais. Somente próximo à placenta corioalantoica, acima do proeminente anel fibrovascular, apresentou um desenvolvimento inicial de pequenas vilosidades. Próximo ao endométrio, o endoderma do saco vitelino mostra ativa secreção e troca.

No tocante à gestação inicial de *Galea spixii*, Miglino et al. (2008) descreveram que o saco vitelino, distante da placenta, sofreu um alongamento superficial. Próximo da ligação com a placenta corioalantoica, visualizam-se proeminentes vilos, completamente vascularizados pelos vasos fetais, com o endoderma recoberto por células colunares em geral e com ativa secreção.

Na capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), Kanashiro et al. (2009) relataram, na gestação inicial, que o saco vitelino está inserido na superfície da margem da placenta. Na fase germinativa dos membros, o saco vitelino visceral é razoavelmente desenvolvido, sendo preso ao disco placentário. A fixação é lateralmente ao endoderma e continua como um epitélio fino, conhecido como saco vitelino parietal. A membrana de Reichert é composta por

poucas células que a compõem. Ultraestruturalmente, na face lateral das membranas celulares, foram encontrados desmosomos. Inúmeras microvilosidades foram observadas na membrana apical das células.

Carter et al. (1998) citaram que, entre o 30º e 35º dia, a placenta de *C. porcellus* encontra-se de forma madura, apresentando revestimento na maior parte de sua superfície por uma camada única de epitélio colunar, embora, do 35º ao 40º dia, a presença de pregas proliferativas ou engrossamento dessa camada de células. O endoderma do saco vitelino parietal apresenta forte imunorreação à citoqueratina com distribuição desigual no citoplasma e com maior expressão na porção basolateral das células e reação negativa, para a vimentina.

As estruturas da placenta apresentam estreitas relações com a membrana de Reichert que é interposta por duas camadas de células, pelo endoderma e o trofoblasto (WISLOCKI; DEANE; DEMPSEY, 1946). Em estudos histológicos e histoquímicos em ratos e camundongos foi verificado que a membrana de Reichert é acelular (WISLOCKI; PADYCUCLA, 1953), com várias camadas (SALAMAT et al., 1993) e constituída por componentes da membrana basal, como a laminina, secretada pelo endoderma parietal (HOGAN; COOPER; KURKINEN, 1980) e glicoconjugados no trofoblasto (SALAMAT et al., 1993).

Carter et al. (1998), em guinea pig, verificaram que a membrana de Reichert não é acelular através das imunomarcações da vimentina e a não reação da citoqueratina, entre o 35º e 40º dia, mostrando um filamento de proteína expressado, somente intracelularmente, e pelos numerosos núcleos orientados paralelamente à superfície da placenta. Dessa forma, o endoderma do saco vitelino descansa sobre uma camada única de células mesenquimais que não é análogo à membrana de Reichert no rato e camundongo, como descrito por Kaufmann e Davidoff (1977). Estes autores sugeriram que essa camada é derivada do mesoderma ectoplacentário e as células mesenquimais correspondem ao tecido subjacente ao epitélio do saco vitelino visceral –o tecido conjuntivo–.

Carter et al. (1998) relataram, nos períodos gestacionais de 35 a 40 dias em guinea pig, que estruturalmente o saco vitelino visceral foi compreendido por uma região membranosa e outra vilosa. O endoderma do saco vitelino voltou-se para o lúmen uterino, constituído por uma simples camada de epitélio colunar com reação da citoqueratina e negativo à vimentina. Esta sobre única camada de células mesenquimais positiva à vimentina. E a camada mais interna de células em contato com o âmnio é supostamente de origem mesenquimal (DUVAL, 1982). Tal camada foi imunolocalizada pela citoqueratina e a vimentina (CARTER et al.,

1998). Ressalta-se que a marcação dupla caracteriza a proliferação de células mesenquimais (JAHN et al., 1993; VIEBAHN, 1995). Entre a camada interna e a externa há uma camada de grupos de células hematopoiéticas que não foram reconhecidos por nenhum marcador. Os vasos vitelínicos imunoreagiram com a vimentina.

A involução do saco vitelino foi verificada no *Cavia porcellus* a partir do 32º dia por Kaufmann e Davidoff (1977), no qual o saco vitelino visceral apresenta, anteriormente, um epitélio prismático alto com a involução do polo da cavidade amniótica oposta à placenta. Depois do desaparecimento da maior parte dos vilos e da involução dos capilares fetais, que tinham um contato com o saco vitelino, o epitélio reduziu-se a uma única camada de revestimento. Esse processo continuou até o término da gestação: no nascimento somente o saco vitelino, que recobre a placenta margeando, e somente uma faixa de aproximadamente 1 cm de saco vitelino livre consiste no saco vitelino viloso, com epitélio prismático alto e com pregas (DEMPSEY, 1953; PETRY; KÜHNEL, 1963).

Na gestação média, no 50º dia, do *Octodon degus* observou-se uma fragmentação aparente do endoderma, através da visualização de grandes espaços entre as células, que é cada vez mais verificado no término da gestação (MESS, 2007a).

Em *Thrichomys laurentinus*, na gestação média, Oliveira et al. (2012a) identificaram que não há cápsula envolta da placenta, mas sim, várias camadas do saco vitelino parietal, que estão associadas ao saco vitelino viloso, com o desenvolvimento da membrana de Reichert. As células do endoderma parietal apresentam inclusões lipídicas, grandes espaços intracelular e microvilosidades no ápice; que através da marcação do P.A.S. sugere a ativa glicosilação do processo de síntese, absorção ou secreção. O saco vitelino visceral está completamente invertido e o anel fibrovascular próximo à placenta corioalantoica.

Em *Kerodon rupestres*, Oliveira et al. (2006) relataram que, em torno da fixação do saco vitelino visceral na placenta na sua superfície lateral, o saco vitelino parietal recobre através com um epitélio colunar, que abrange as vilosidades a um fino tecido conjuntivo, que aparenta ser pseudoestratificado. Esse epitélio repousa sobre uma membrana de Reichert. Ultraestruturalmente essas células possuem um núcleo arredondado e são unidas por desmosomos. Numerosas microvilosidades são projetadas no espaço entre as células e são a continuidade da cavidade uterina. Em adição, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, o citoplasma contém corpos multivesiculares.

Ainda em *Kerodon rupestres*, Oliveira et al. (2006) acrescentaram que a inversão do saco vitelino visceral continua até o término da gestação e que, próximo à ligação da placenta

corioalantoica, forma um anel fibrovascular. A parte do saco vitelino, próximo à placenta, apresenta elaboradas vilosidades e a porção antimesometrial é lisa. A face dos vilos, voltada ao lúmen uterino, é revestida por um epitélio colunar de origem endodérmica. E, entre o endoderma e o mesotélio, apresenta uma camada de tecido conjuntivo com numerosos vasos vitelínicos. O epitélio, do saco vitelino visceral, é composto de células irregulares com o núcleo voltado à base. As membranas plasmáticas das células adjacentes são unidas por junções complexas e, ao longo da margem lateral de desmosomos, no ápice das células, apresentam microvilosidades. A presença de pequenas invaginações no ápice do citoplasma, da membrana plasmática, é encontrada relacionando-se com prováveis vesículas endocíticas. Essa região do citoplasma contém grandes vesículas e absorção de material elétron denso. Essas células são ricas em mitocôndria, proeminente complexo de Golgi e pouco retículo endoplasmático granuloso.

Na fase média da gestação da capivara (aos 70 dias), a fixação do saco vitelino visceral com o disco, passa a possuir uma forma de anel fibrovascular, como é conhecido nos outros roedores histricomorfos. Encontram-se vilosidades em todo o saco vitelino, exceto no anel fibrovascular do disco placentário, e a maior parte do saco vitelino parietal consistiu em uma única camada de células. A ultraestrutura das células continua a mesma da fase germinativa, porém a membrana de Reichert é visivelmente mais espessa. No 90º dia de gestação, a cápsula, que abrange o conceito, é longa e o saco vitelino visceral está exposto ao lúmen uterino (KANASHIRO et al., 2009).

No *Dasyprocta leporina*, nas gestações média e final, a área do saco vitelino está adjacente à placenta corioalantoica. Apresenta grande quantidade de vilosidades que estão justapostas à cápsula envolvente da placenta corioalantoica. Em contraste, a área distante da placenta não apresentou vilos (MIGLINO et al., 2008).

Nas gestações média e final, Miglino et al. (2008) descreveram em *Galea spixii* que a área adjacente à placenta corioalantoica é extremamente vilosa e bem vascularizada. Vilosidades essas proeminentes que estão associadas à placenta corioalantoica e as multicamadas que recobrem a placenta do saco vitelino parietal.

Em *Cuniculus paca*, Miglino et al. (2008) relataram que, nas gestações média e final, a presença de grânulos pequenos e de partículas elétron densas na porção superior do endoderma do saco vitelino, porém com a ausência de grandes vacúolos. Indica a redução da troca de substâncias, tanto próximos como distantes da placenta. O endoderma possui grandes

espaços entre as células, essa condição é associada à transferência de fluídos a partir do lúmen, em direção às células da base de vários mamíferos.

Ainda sobre *Cuniculus paca*, Bonatelli et al. (2005) informaram que, entre as gestações média e final, o saco vitelino parietal recobre grande parte do disco placentário através de um epitélio colunar alto, sobre uma membrana de Reichert. Ultraestruturalmente, as células são irregulares, com o núcleo localizado na base, e na superfície apical, apresentam microvilosidades com cavidades. A região supranuclear contém vacúolos, vesículas, mitocôndrias tubulares e o retículo endoplasmático granular. Desmosomos são encontrados na superfície lateral. Já o saco vitelino visceral é invertido e relaciona-se com a porção fetal da placenta corioalantoica, através de vilosidades, que, logo após, formam o anel fibrovascular. Toda essa estrutura é sustentada por um eixo de mesênquima. Ultraestruturalmente, essa superfície possui numerosas microvilosidades, com pequenas vesículas e túbulos, na sua maioria, na região apical do citoplasma. Essa região também apresenta grandes vesículas e vacúolos que contêm material elétron denso. Possui pequenos complexos de Golgi no citoplasma perinuclear; no citoplasma, como um todo, apresenta mitocôndrias e retículo endoplasmático granular; os desmosomos e as barras terminais estão presentes entre as membranas.

Esses autores (BONATELLI et al., 2005) acrescentaram ainda que essas células apresentam alto índice de endocitose, como encontrado no guinea pig (KING; ENDERS, 1970c), chinchila (KING; TIBBITTS, 1976) e *Kerodon rupestris* (OLIVEIRA et al., 2006). E que essas vesículas endocíticas são formadas e transportadas pela membrana lateral e dentro de espaços vazios intercelulares pela exocitose (KING, 1982). As imunoglobulinas são presumidas até alcançar os capilares fetais; e as proteínas não podem ser movidas entre os espaços intercelulares devido às estreitas junções no ápice da célula (KING, 1982).

Perto do término da gestação, 65º dia, várias alterações degenerativas são aparentes (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961): um endoderma do saco vitelino parietal descontínuo (BJELLIN; SJÖQUIST; CARTER, 1975) e pouca marcação à citoqueratina (CARTER et al., 1998).

No término da gestação, no 84º dia do *Octodon degus*, o saco vitelino parietal está cada vez mais fragmentado (MESS, 2007a). E no *Galea spixii*, o endoderma das áreas vilosas possui alta secreção e transferência ativas, através da visualização de vacúolos, grandes partículas elétron densas e gotículas densas (MIGLINO et al., 2008).

Os dados referentes às citações sobre o desenvolvimento do saco vitelino no guinea pig foram listados no Quadro 1.

3.5.4 Funções do saco vitelino

O saco vitelino é essencial para o desenvolvimento embrionário, pois em fases iniciais ele é responsável pelo armazenamento e transferência do vitelo. O vitelo é um líquido armazenado pelo saco vitelino, para suprir as necessidades nutricionais do embrião até que o cordão umbilical ou a placenta verdadeira estejam estabelecidos (RIVEROS et al., 2010).

Muitos autores enfatizam a grande importância funcional do saco vitelino para os processos metabólicos entre a mãe e o feto (ASAI, 1914; ANDERSON; LEISSRING, 1961; LEISSRING; ANDERSON, 1961; LARSEN, 1963a,b; PADYKULA; DEREN; WILSON, 1966; KRYZOWSKA-GRUCA, 1967; CARPENTER; FERM, 1969; KING; ENDERS, 1970a,b). Entretanto, alguns estudos mostraram que o saco vitelino também tem influência essencial nos processos metabólicos e no transporte durante o período final da gestação (KING; ENDERS, 1970b; KING, 1972; KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977).

Bloom e Bartelmez (1940) e Rüsse et al. (1992) descrevem que o saco vitelino é o primeiro órgão hematopoiético do embrião, além de demonstrar uma importante atividade de macrofagocitose, biossíntese de proteínas e transporte de nutrientes para o embrião, até o fígado embrionário ter amadurecido suficientemente para exercer estas funções (CLINE; MOORE, 1972; GITLIN; PERRICELI, 1972; ENDERS; WINSATT; KING, 1976; TIEDEMANN, 1979; MINUTH; TIEDEMANN, 1980; TIEDEMANN; MINUTH, 1980; SHI et al. 1985; MIGLIACCIO et al., 1986; PALIS; MCGRATH; KINGLEY, 1995; BIELINSKA et al., 1996; YAMASHITA, 1996; PALIS; YODER, 2001; MIGLINO, 2009; RIVEROS, 2009; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010). Além disso, muitas das proteínas, secretadas pelo endoderma do saco vitelino, também estão expressas no fígado (MEEHAN et al., 1984; SOPRANO; SOPRANO; GOODMAN, 1986; THOMAS; SOUTHWELL; SCHREIBER, 1990; LIU et al., 1991).

Em muitas espécies de mamíferos, o saco vitelino produz e transporta proteínas necessárias ao desenvolvimento do embrião (WOLF et al., 2003; RIVEROS, 2009), de forma seletiva (KING, 1982), participa no intercâmbio de metabólitos (DOCHERTY et al., 1996),

podendo ser um excelente modelo para estudo de toxicidade (USAMI; MITSUNAGA; NAKAZAWA, 2007). Atua na degradação de proteínas pelo saco vitelino que, mais uma vez, oferece um importante papel na nutrição fetal (KING, 1982). Sua função nos mamíferos é complexa, participando da hematopoiese (BLOOM; BARTELMEZ, 1940; HOYES, 1969; HESSELDEHL; LARSEN, 1969; FUKUDA, 1973; TIEDEMANN, 1979; MIGLIACCIO et al., 1986; BJÖRKMAN; DANTER; LEISER, 1989; KATAYAMA; KAYANO, 1999; MOORE; PERSAUD, 2004) e transferência de material materno, tais como vitaminas (DEREN; PADYKULA; WILSON, 1966a; PADYKULA; DEREN; WILSON, 1966), aminoácidos (DEREN; PADYKULA; WILSON, 1966b; BUTT; WILSON, 1968; GITLIN; PERRICELI, 1972; LLOYD et al., 1976; SHI et al., 1985) e imunoglobulinas (BRAMBELL, 1958), até o fígado embrionário ter amadurecido suficientemente para exercer estas funções (RIVEROS, 2009). Tiedemann (1979) afirmou que o saco vitelino de gatos possui vasos sanguíneos fenestrados e apresenta membrana basal completa. Estas condições são favoráveis à passagem de proteínas e de células sanguíneas, produzindo ainda as células germinativas, que constituirão as células precursoras dos gametas: espermatozóides e oócito (WITCHI, 1948; BJÖRKMAN; DANTER; LEISER, 1989; WROBEL; SÜß, 1998; TAPIOL, 2001).

O saco vitelino tem sido reconhecido, por muito tempo, por ter a função hepática fetal como a hematopoiese e proteínas de “soro”, durante o início do desenvolvimento embrionário (LIU et al., 1991).

Riveros (2009) descreveu a análise proteômica (estrutural e bioquímica) do saco vitelino em bovinos e encontrou aos 23 e 37 dias de gestação a presença de 970 a 1230 proteínas contidas no saco vitelino, respectivamente. O saco vitelino de 23 dias apresentou proteínas essenciais, diferencialmente expressas nos estágios de desenvolvimento, como Hemogen, proteína responsável pelo controle da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas; a glicoproteína-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferase-1, envolvida nos processos de angiogênese, trombopoiese e no desenvolvimento da homeostase nos rins; a proteína fator de transcrição cório-específico necessária para o desenvolvimento da placenta. O saco vitelino de 37 dias possui proteínas essenciais deste estágio como a apolipoproteína que medeia a ligação, inter-sinalização e catabolismo das partículas de lipoproteína, podendo servir como uma ligação para o receptor de LDL e para receptores específicos de apolipoproteína e dos tecidos hepáticos durante a embriogênese. Estas proteínas serão de vital importância para o desenvolvimento do embrião até a formação da placenta.

Nos roedores, o saco vitelino é o principal órgão nutritivo do embrião antes da formação da placenta alantóica funcionante. No camundongo, o saco vitelino é desenvolvido e similar ao da ratazana, envolvendo completamente o âmnio através da maior parte da gestação (RENFREE; HENSLEIGH; MCLAREN, 1975). Em muitos roedores e lagomorfos, o saco vitelino é ativo na nutrição do embrião e do feto (KING, 1982), ou seja, nestas espécies o saco vitelino persiste também durante o período fetal.

Recentemente foi descrito, também, que os eritrócitos do saco vitelino de humano além de transportar o oxigênio e o dióxido de carbono, cumprem a função de nutrir o embrião durante a quinta semana de gestação através do ducto vitelino (PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010).

De acordo com Brambell (1958), o saco vitelino é responsável também pela imunidade passiva pré-natal, no momento inicial da implantação em coelhos e guinea pig e em fases finais de gestação em ratos e camundongos. Gulbis et al. (1998) sugeriram que o saco vitelino foi uma importante zona de transferência entre as cavidades embrionária e extraembrionária e pode ajudar a desenvolver protocolos de terapia gênica por meio de injeção de células na cavidade exocelômica.

Materiais e Métodos

A decorative graphic consisting of two horizontal lines and two vertical lines intersecting to form a cross-like shape, positioned to the right of the section header.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas dos materiais e métodos referem-se a: 4.1 obtenção do saco vitelino, 4.1.1 animais e amostras, 4.1.2 acasalamento, 4.2 coleta do material, 4.3 caracterização morfológica das estruturas do saco vitelino, 4.3.1 microscopia de luz, 4.3.2 microscopia eletrônica de transmissão e 4.3.3 imunolocalizações da citoqueratina, vimentina e expressão do PCNA (proliferatin cell nuclear antigen).

4.1 OBTENÇÃO DO SACO VITELINO

Para obtenção das amostras do saco vitelino, em diferentes períodos gestacionais: 12°, 14°, 16°, 18°, 22°, 30°, 40° e 55° dia foram utilizadas 17 fêmeas da espécie *Cavia porcellus*, procedentes de um criatório particular na cidade de Gonçalves-MG, e os materiais coletados foram adicionados à Coleção da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Laboratório de Anatomia Animal.

O material histórico que foi utilizado para re-examinação da implantação precoce e da inversão do saco vitelino em *Cavia porcellus*, derivou-se de lâminas histológicas da Embryological Collection of the Museum of Natural History Berlin, Germany (Hill collection); o seguinte material foi registrado: ROD-122 (6° dia de gestação), ROD-129 (7° dia), ROD-130 (8° dia) e ROD-132 (9° dia).

4.1.1 Animais e amostras

Os animais foram transferidos e alojados no Biotério de Bioquímica e Biofísica (padrão SPF) do Instituto Butantan, em caixas brancas de polipropileno (Figura 1 A). Todas elas foram forradas por uma camada de serragem e os animais receberam água e ração ad libidum, com suprimento adicional de vitamina C através do Roevit®¹, produto que foi

¹ LABCON, lote R0070

diluído na água oferecida aos animais (1 gota/50 ml). A limpeza das caixas dos animais foi realizada três vezes por semana.

4.1.2 Acasalamento

As fêmeas foram alojadas em grupos de três por caixa, os machos foram alojados individualmente. As fêmeas foram transferidas para as caixas dos machos ao final da tarde para pernoite, retiradas na manhã seguinte entre sete e oito da manhã. Cada fêmea foi avaliada por meio de esfregaços vaginais, para averiguação do ciclo estral e presença de espermatozoides, indicativos de acasalamento.

Prevenindo que fêmeas gestantes participassem do experimento, todas as fêmeas transferidas ao Biotério eram nulíparas. A identificação da gestação ocorreu através da citologia esfoliativa vaginal, método que monitora a esfoliação do epitélio vaginal diariamente.

A coleta dos esfregaços vaginais foi realizada diariamente em cada uma das 17 fêmeas, entre sete e oito horas da manhã, no período de 20 de setembro de 2011 a 09 de maio de 2012, no Biotério supracitado.

Antes da coleta, diariamente foi realizada a assepsia da vulva de cada uma das fêmeas com gaze umedecida em solução fisiológica, evitando a contaminação do material coletado e dos animais. Após a limpeza da genitália externa das fêmeas de *Cavia porcellus*, foi feito o esfregaço com auxílio de um swab de algodão estéril, inserido na vagina no sentido crânio-dorsal e com movimentos de rotação no interior da vagina, para colher as células descamativas e espermatozoides.

Esse material, coletado anteriormente pelo swab foi transferido para lâminas de microscopia através de movimentos de rotação, da esquerda para direita e de cima para baixo, espalhando uniformemente. Essas lâminas foram identificadas com o número do animal e a data da coleta. Após a coleta, aguardou-se a secagem completa dos materiais antes de serem coradas. Os esfregaços vaginais foram corados pelo método de Romanowski modificado, denominado “panótico-rápido” da marca Laborclin®².

² LABORCLIN produtos para laboratórios Ltda, lote 11228001

Para a coloração, as lâminas, com as amostras, foram submersas em solução nº 1 (Tiariletano) durante 10 segundos; em seguida as amostras foram transferidas para a solução nº 2 (Xantenos) durante 10 segundos; e concluindo, submergindo na solução nº 3 (Tiazina) durante 10 segundos. Logo após a coloração, as amostras foram examinadas e fotografadas em fotomicroscopia de luz, para se estabelecer se havia presença de espermatozoides (Figura 1 B).

Ressaltasse que todas as coletas e análises através do microscópio óptico foram realizadas pelo mesmo pesquisador, visando evitar alterações no esfregaço e métodos diferentes de leitura.

Figura 1 – Fotografias e fotomicroscopias elucidativas do material e métodos

Legenda: em A, fotomacroscopia de um casal de *Cavia porcellus*, mantido em caixa branca de polipropileno, no Biotério de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Em B, fotomicroscopia da citologia vaginal esfoliativa da fêmea nº 2 do dia 28 de março de 2012, mostrando a presença de espermatozoides (setas claras). Coloração: Romanowski modificado. B Barra - 100 µm. E em C, fotomacroscopia de um útero gestante de *Cavia porcellus* no 12º dia; evidenciar a intensa vascularização uterina (setas). C – 1 cm.

4.2 COLETA DO MATERIAL

Os animais inicialmente sofreram uma contenção química dividida em dois períodos: o pré-anestésico, utilizando o Acepran (acepromazina) na dose de 0,05 mg/kg na via intramuscular e a indução anestésica o Telazol (Cloridrato de Tiletamina 125 mg mais cloridrato de Zolazepan 125 mg) a 20 mg/kg via intravenosa. Após atingirem o plano anestésico profundo, os animais foram eutanasiados através da administração de 10 ml Cloreto de Potássio 19,1% via intracardíaca. A confirmação da eutanásia foi pela ausência das frequências cardíaca e respiratória, reflexo do globo ocular com relaxamento muscular.

O acesso à cavidade abdominal foi efetuado por uma incisão na linha mediana do abdome, o útero gestante foi isolado (Figura 1 C) e coletado imediatamente após a morte do animal. Nas fases iniciais da gestação, 12º, 14º, 16º e 18º dia, não foi necessário a separação do útero dos anexos embrionários ou fetais, para o seu armazenamento, diferente das fases médias a tardias, 22º, 30º, 40º e 55º dia, que foram coletados apenas os sacos vitelinos. Dessa forma, o material coletado foi acondicionado em frascos previamente identificados, contendo soluções de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C e glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C; além da fixação das gestações do 22º e 40º dia em metacarn 4% (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético).

O material coletado foi processado nos Laboratórios do Setor de Anatomia – Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A nomenclatura utilizada foi referida conforme estabelecido pelo International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2005), International Committee on Veterinary Histological Nomenclature (1994) e International Committee on Veterinary Embryological Nomenclature (2006).

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESTRUTURAS DO SACO VITELINO

4.3.1 Microscopia de luz

Para o estudo histológico foram utilizados fragmentos dos sacos vitelinos, coletados em diferentes fases de gestação já previamente fixados. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato ou água destilada para retirar o fixador, seguido de desidratação de uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), diafanizado em xilol e, em seguida, os cortes foram embebidos em parafina sintética (Histosec®)³ (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram submetidos à microtomia em micrótomo automático (Leica, Rm 2165), visando obter cortes de 5µm, os quais foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C.

Após serem desparafinizados os cortes, foram corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina – HE (TOLOSA et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2006) e reação histoquímica de P.A.S. (ácido periódico de Shiff), contra corada com hematoxilina.

Em seguida, o material foi analisado e as características morfológicas encontradas foram documentadas.

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a caracterização ultraestrutural do saco vitelino de *Cavia porcellus*, foram obtidos fragmentos acerca de 0,5 cm² de diferentes regiões do saco vitelino; armazenados em solução de 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 por três vezes, durante 10 minutos cada. Logo após, procedeu-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio (tamponado em fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4) a 2% por duas horas.

³ HISTOSEC-MERCK, lote k91225309

Concluída a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em solução tampão por três vezes durante 10 minutos cada. Após a lavagem, imergiram-se estes fragmentos em acetato de uranila aquosa, saturada por 1 hora ao abrigo da luz, sendo posteriormente lavados em tampão e finalmente submetidos à desidratação em álcool etílico sob concentrações crescentes: 50%, 70%, 80%, 90% e 95% (10 minutos em cada álcool) e em álcool etílico absoluto, realizando-se 4 trocas em intervalos de 20 minutos.

Após a passagem pela bateria de álcool etílico, lavaram-se os fragmentos em óxido de propileno, durante 10 minutos, garantindo assim uma total desidratação, e, em seguida, 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, até completa polimerização.

Obtidos os blocos, foram confeccionados cortes semifinos com 0,4 µm de espessura em ultramicrotomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems, Germany), corando-se em solução aquosa de azul de Toluidina a 1% e analisando-os em microscópio de luz, a fim de identificar as áreas de interesse, para obtenção dos cortes ultrafinos. Para isto, os cortes feitos com 0,07 µm de espessura foram coletados em telas de cobre e contrastado 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. No final, o material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega View III câmera, Soft imaging, Germany) e as regiões do saco vitelino foram eletromicrografadas.

4.3.3 Imunolocalizações da citoqueratina, vimentina e expressão do PCNA (proliferatin cell nuclear antigen)

As primeiras reações de imunohistoquímicas foram realizadas em cortes dos diversos sacos vitelinos e nos diferentes estágios gestacionais com os objetivos de imunolocalizar a citoqueratina (anticorpo primário anti-humano monoclonal camundongo 1:300; M0821, Dako, Carpinteria, CA, USA), para identificação das células epiteliais e trofoblásticas, a vimentina (anticorpo primário monoclonal camundongo 1:300; 0.N.602, sc-73259,

Biotecnologia Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), para identificação do endotélio vascular. Além disso, foi utilizada a marcação com o PCNA – proliferatin cell nuclear antigen (anticorpo primário monoclonal camundongo 1:400; PC10, sc-56, Biotecnologia Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), para verificar as regiões do saco vitelino que estavam em proliferação celular.

Os cortes histológicos permaneceram 12 horas em estufa a 70°C e, em seguida, foram desparafinizados em xilol e, na segunda passagem de etanol 100%, os cortes tiveram a peroxidase endógena, bloqueada em 3% H₂O₂ em etanol 100% por 20 minutos. Estes cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, e, em seguida, tratados com tampão citrato 0,1 M pH 6,0 e irradiados em micro-ondas de uso caseiro, na potência máxima (700MHz), três vezes durante cinco minutos. Depois os cortes foram equilibrados em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1 M 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 realizadas em câmaras úmidas durante 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, os cortes foram lavados e incubados com os anticorpos secundários, conjugados com peroxidase Kit Dako LSAB (K 0690, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 15 minutos, seguido de streptoavidina do mesmo Kit por 15 minutos. A reação foi visualizada pela adição do revelador DAB (Revelador Líquido DAB + Substrate Chromogen System, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), seguido de contracoloração com hematoxilina e montagem em Paramount (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

Resultados

5 RESULTADOS

A implantação embrionária do *Cavia porcellus* inicia-se no 6º dia com a mórula, começando a penetração na parede do útero (Figuras 2 A, B e C). No 7º dia, o blastocisto continua a penetrar-se profundamente até que a mucosa do útero se feche, recobrendo o mesmo. Além disso, inicia-se a diferenciação celular das camadas do blastocisto no cone ectoplacentário, trofoectoderma (Figura 2 D) e disco embrionário. Nos 6º e 7º dia observa-se a proliferação do endométrio, principalmente na região em que está sendo invadido pela aposição da mórula ou blastocisto.

Figura 2 - Fotomicroscopias do útero de *Cavia porcellus*, evidenciando a implantação embrionária, no 6º dia (A, B e C) e 7º dia (D) de gestação

Legenda: mórula (M), útero (Ute), cone ectoplacentário (CEP) e trofoectoderma (T). Colorações: Hematoxilina e Eosina. A, barra = 500 µm, B, C e E = 250 µm.

No 8º dia, continua a diferenciação dessas camadas, com uma invadindo o polo mesometrial, originando o cone ectoplacentário, e outra –polo anti-mesometrial– que forma o disco embrionário (Figuras 3 A e B).

No 9º dia, a forma do blastocisto se assemelha a um cilindro e, com o desenvolvimento de suas camadas, forma-se inicialmente o endoderma –camada que reveste a cavidade do blastocisto– sendo a camada mais interna do endoderma a precursora do saco vitelino visceral e a mais externa o saco vitelino parietal (Figuras 3 C e D).

Figura 3 - Fotomicroscopias do blastocisto, no 8º dia (A e B) e 9º dia (C e D) de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: o cone ectoplacentário (CEP), o trofoectoderma (T), o disco embrionário (DE), o saco vitelino (SV), dividido em visceral (SVV) e parietal (SVP). Colorações: Hematoxilina e Eosina. A, B e D Barra = 250 µm e C = 500 µm.

No 12º dia, observa-se o desenvolvimento inicial da placenta corioalantoica e do saco vitelino, podendo distinguir o saco vitelino parietal do saco vitelino visceral. No primeiro, o endoderma já se encontra com várias camadas, típico do epitélio pseudoestratificado (Figuras 4 A e F). Ultraestruturalmente, identifica-se que o endoderma parietal está em constante

divisão, notando o núcleo com cromatina dispersa (Figura 4 B). Essas células endodérmicas são constituídas por inúmeras vesículas e gotículas refringentes que ocupam a maior parte do citoplasmas (Figura 4 B) e o retículo endoplasmático granular está presente, porém sua disposição varia entre as camadas. Na camada próxima à placenta corioalantoica, essas organelas estão localizadas nas proximidades do núcleo (Figura 4 C) e próximo ao lúmen se restringe à porção apical (Figura 4 D); porção esta que não apresenta microvilosidades. Entre essas células observa-se a presença de fracas junções intercelulares (Figura 4 E) e, separando o endoderma da placenta corioalantoica, não se encontra a membrana de Reichert e, sim, um espaço que está constituído de grandes vacúolos e de material extracelular (Figuras 4 A e F).

Figura 4 - Fotomicroscopia (A) e eletromicrografias de transmissão referentes à figura 4 A (B-F) do saco vitelino parietal, no 12º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, a placenta corioalantoica (Pla) é revestida por um endoderma pseudoestratificado do saco vitelino parietal (SVP) e entre os dois nota-se a presença de uma camada de material extracelular (MEC). Coloração: Azul de Toluídina. A Barra = 50 μm . Em B, nota-se que o núcleo das células endodérmicas (End) apresenta cromatina dispersa (setas claras) e a presença de numerosos vácuolos refringentes (setas escuras). B = 5 μm . Em C e D, as camadas inferior (C) e superior (D) do endoderma (End) parietal, evidenciando as vesículas refringentes (setas escuras) e a grande quantidade de retículo endoplasmático granular (setas claras) na região perinuclear em C e na região apical em D. C e D = 2 μm . Em E, as fracas junções intercelulares (setas claras) do endoderma (End), além de identificar as vesículas refringentes (setas escuras) no citoplasma. E = 2 μm . E em F, visão panorâmica do endoderma (End) e da placenta corioalantoica (Pla), evidenciando a presença de um material extracelular (setas escuras) separando-as. F = 10 μm .

E, no saco vitelino visceral, identifica-se o desenvolvimento inicial de vasos fetais próximo a placenta corioalantoica (Figura 5 A); nota-se que o endoderma está voltado à direção uterina, caracterizando a ocorrência de inversão e seu epitélio é classificado como colunar (Figuras 5 A e B). Ultraestruturalmente, a constituição do endoderma visceral se assemelha ao parietal, apresentando a cromatina dispersa nos núcleos, inúmeras vesículas e gotículas refringentes ao longo do citoplasma (Figuras 5 C e D), e o predomínio de retículo endoplasmático granular na região próximo ao núcleo; não é verificada a presença de microvilosidades (Figura 5 D). As células endodérmicas estão sustentadas por uma membrana basal já consolidada (Figura 5 C) e, abaixo dessa camada, observa-se uma organização de células ao longo do tecido conjuntivo.

Figura 5 - Fotomicroscopias (A e B) e eletromicrografias de transmissão (C e D) referentes à figura 5 B do saco vitelino visceral, no 12º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, nota-se que o endoderma do saco vitelino visceral (SVV) está voltado ao útero (Ute); além de identificar uma formação de um vaso fetal (VF) próximo a placenta. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em B, o endoderma visceral apresenta um epitélio simples colunar, sobre o tecido conjuntivo (TC). A e B Barra = 50 μ m. Em C, as células do endoderma (End) apresentam núcleos, com cromatina dispersa (setas escuras) e numerosos vacúolos refringentes (setas claras), ao longo do citoplasma, além de visualizar a membrana basal (MB) e o tecido conjuntivo (TC). C = 5 μ m. E em D, a cromatina dispersa (setas escuras) e a superfície apical das células endodérmicas (End) que não apresentam microvilosidades (setas claras). D = 2 μ m.

No 14º dia, a placenta corioalantoica apresenta-se na forma inicial de um disco, envolvendo a placenta e acompanhando esse crescimento. O saco vitelino parietal encontra-se mais estratificado. A imunolocalização da citoqueratina teve reação no endoderma do saco vitelino parietal.

Todas as camadas do saco vitelino visceral já são distintas, o endoderma, de epitélio simples colunar com a presença de vesículas na porção basal, porém em algumas regiões observa-se um epitélio complexo em agrupamento dessas células. No saco vitelino visceral perto da placenta, o tecido conjuntivo já apresenta a formação dos vasos fetais com o mesotélio subjacente (Figuras 6 A e B). O desenvolvimento dessas camadas foi observado

pelas reações da citoqueratina, no endoderma (Figura 6 B), e da vimentina, nas formações vasculares do tecido conjuntivo longe da placenta (Figura 6 C).

Os grandes vasos fetais, antes de chegarem ao feto, apresentam formações fibrosas em volta das artéria e veia fetais –conhecida como anel fibrovascular– que está em íntima relação com o saco vitelino visceral, podendo distinguir capilares na extremidade desse anel (Figura 6 D).

Figura 6 - Fotomicroscopias do saco vitelino visceral, no 14º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, a distinção das camadas do saco vitelino visceral perto da placenta, com as células endodérmicas (End), constituída por um epitélio simples colunar com vacúolos refringentes na porção basal (setas), o tecido conjuntivo apresenta formação de vasos fetais (VF) com o mesotélio (Met) subjacente; coloração: Hematoxilina e Eosina. A Barra 50 µm. Em B, a reação da citoqueratina nas células epiteliais do saco vitelino visceral perto da placenta, apresentando um epitélio complexo; com as demais camadas: o tecido conjuntivo (TC) e o mesotélio (Met). B = 200 µm. Em C, a marcação das células de origem mesenquimal que indicam os vasos fetais (VF) no saco vitelino visceral longe da placenta C = 200 µm. E em D, a artéria fetal (AF), sendo revestida por uma estrutura fibrosa, o anel fibrovascular (AFV), que se relaciona com o saco vitelino visceral (SVVI). Na periferia desse anel, encontra-se uma rede de capilares (Cap). D = 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

No 16º dia, distingui-se a placenta corioalantoica, o saco vitelino parietal e o saco vitelino visceral (Figura 7 A).

O crescimento do endoderma do saco vitelino parietal é evidente, com a marcação da proliferação nuclear das células e pelo aumento do seu número (Figuras 7 A e B). Entretanto, esse desenvolvimento celular não se dá na forma de camadas como visto nos estágios anteriores, mas através de projeções iniciais que partem da placenta corioalantoica, semelhante às árvores. A membrana de Reichert encontra-se espessada, sendo constituída por material amorfo (Figura 7 C).

O saco vitelino visceral inicia a formação de ligeiras pregas na região próxima da placenta. Morfologicamente, o seu endoderma apresenta as delimitações entre os limites das células epiteliais e o tecido conjuntivo apresenta um desenvolvimento maior que nas outras camadas. Nas imunolocalizações, o saco vitelino visceral próximo a placenta reagiu à citoqueratina e à proliferação nuclear. Nessa última, a marcação se estende a todas as camadas, tendo predomínio no tecido conjuntivo (Figura 7 D). No entanto, observa-se que a reação da vimentina nesse estágio gestacional apresenta maior quantidade de vasos, através da marcação das células endoteliais (Figura 7 E).

O anel fibrovascular encontra-se revestido por maior quantidade de material fibroso, além de possuir uma vascularização mais evidente, através de capilares na sua extremidade (Figura 7 F).

Figura 7 - Fotomicroscopias do saco vitelino, no 16º dias de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A e B, imunolocalizações da expressão do PCNA. Em A, com vista panorâmica da placenta corioalantoica (Pla), do saco vitelino parietal (SVP) e o saco vitelino visceral (SVVI), identificando a marcação no saco vitelino parietal. E em B, maior aumento do saco vitelino parietal (SVP) com a marcação nuclear (setas) indicativo de proliferação celular. A Barra = 200 μ m e B = 50 μ m. Em C, o controle negativo da imunohistoquímica supracitada no saco vitelino parietal (SVP), impedindo a identificação das camadas do seu endoderma. É sustentada por uma espessa camada de material amorfo, a membrana de Reichert (MR), que relaciona-se abaixo com a placenta corioalantoica (Pla). C = 50 μ m. Em D, a imunorreacção da expressão do PCNA no saco vitelino visceral perto da placenta, notando a marcação do endoderma (End), tecido conjuntivo (TC) com vasos fetais (VF) e mesotélio (Met); com predominante expressão no tecido conjuntivo. D = 50 μ m. Em E, a imunolocalização marca as células mesenquimais através da vimentina, observando a maior quantidade de vasos fetais (VF). E = 50 μ m. E em F, a relação da veia fetal (VeF) cortada longitudinalmente, o saco vitelino visceral (SVVI) e o anel fibrovascular (AFV), com maior quantidade de capilares (Cap) em sua extremidade. Coloração: Hematoxilina e Eosina. F = 100 μ m.

Mediante a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, observa-se o início da formação de grandes projeções citoplasmáticas no endoderma parietal (Figura 8 A), em direção ao lúmen, com numerosas microvilosidades (Figuras 8 A e B). Estruturalmente, o retículo endoplasmático granular se orienta na porção apical do citoplasma, juntamente com as vesículas e os grandes vacúolos refringentes, bem como a observação inicial das junções intercelulares do endoderma (Figura 8 A). Nota-se que a membrana de Reichert é constituída de material amorfo sem a presença de células (Figuras 8 B e C).

Na porção apical do endoderma do saco vitelino visceral, observa-se a relação de numerosas vesículas refringentes com a membrana plasmática e as microvilosidades (Figura 8 D). Além disso, já é visualizado o complexo de Golgi ao longo do citoplasma (Figura 8 D), juntamente com o retículo endoplasmático granular. As interações celulares já são observadas e a membrana basal encontra-se sustentando esse tecido (Figuras 8 E e F). Abaixo do endoderma do saco vitelino visceral próximo a placenta, o tecido conjuntivo já se encontra organizado com os primeiros vasos fetais sendo revestido pelas células endoteliais (Figuras 8 E e F) e preenchidos por hemácias nucleadas (Figura 8 E).

Figura 8 - Eletromicrografias de transmissão referentes às figura 8 C (A-C) e figura 8 D (D-F) do saco vitelino, no 16º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, no endoderma parietal apresenta formação inicial de projeções citoplasmáticas (Proj). Essas projeções se relacionam com grandes vacúolos refringentes (setas escuras); além de identificar a presença de junções intercelulares mais estabelecidas (setas claras). A Barra = 2 μ m. Em B, a presença de vesículas e grandes vacúolos refringente (setas escuras) no citoplasma e o retículo endoplasmático granular (setas claras), localizado na região apical, além de identificar a membrana de Reichert (MR), o trofoblasto (Trof) e as microvilosidades (MV). B = 5 μ m. Em C, o endoderma (End) parietal, com vesículas refringentes (setas escuras), sobre a membrana de Reichert (MR) que separa o endoderma da placenta corioalantoica (Pla). C = 2 μ m. Em D, o endoderma (End) do saco vitelino visceral, apresentando inúmeras vesículas (seta escura) que se relacionam com as microvilosidades (MV) e a presença do complexo de Golgi (setas claras); além de encontrar a membrana basal (MB). D = 2 μ m. Em E e F, a primeira identificação dos vasos fetais (VF) no tecido conjuntivo (TC) no saco vitelino visceral perto da placenta. Em E, esses vasos são preenchidos por hemácias que apresentam núcleo (setas claras) e presença de grandes vesículas ao longo (setas escuras) do citoplasma. E em F, a identificação das células endoteliais (seta clara) do saco vitelino visceral. E e F = 10 μ m.

No 18º dia, o endoderma do saco vitelino parietal apresenta variações quanto à espessura de acordo com a sua localização. Na região próxima do anel fibrovascular, o endoderma é delgado e constituído apenas por uma camada, região esta com poucas células marcadas pela citoqueratina, porém com a marcação da membrana de Reichert (Figura 9 A).

Os grandes vasos fetais são circundados por um anel fibrovascular, constituído por uma espessa camada de tecido conjuntivo, revestindo suas extremidades. Observa-se o endoderma com uma única camada de células epiteliais e dele surgindo uma fina membrana – o saco vitelino visceral– (Figura 9 B).

No saco vitelino visceral encontram-se projeções que se localizam próximo à margem da placenta corioalantoica, formando as primeiras vilosidades (Figura 9 C).

Longe da placenta, o saco vitelino visceral continua o seu desenvolvimento, como foi verificado pelas reações imunohistoquímicas. A citoqueratina marca os citoplasmas das células endodérmicas e a vimentina, com maior frequência, os vasos fetais (Figuras 9 D e E). A imunomarcação da proliferação celular predomina no tecido conjuntivo (Figura 9 F).

Figura 9 - Fotomicroscopias do saco vitelino, no 18º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, a expressão da citoqueratina no endoderma (End) do saco vitelino parietal com a marcação na membrana Reichert (MR). Além de identificar a placenta corioalantoica (Pla) e o espaço sanguíneo materno (ESM). Em B, o corte transversal da artéria fetal (AF) e do anel fibrovascular (AFV) com grande quantidade de tecido conjuntivo (TC), revestindo externamente uma única camada de endoderma (End). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em C, o saco vitelino visceral (SVVI) próximo à margem placentária, com desenvolvimento inicial de vilosidade do saco vitelino (VSV). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em D, a imunomarcação do endoderma (End) do saco vitelino, longe da placenta, pela citoqueratina, com a presença de vasos fetais (VF) e de mesotélio (Met). Em E, a imunolocalização dos vasos fetais (VF) do saco vitelino, distante da placenta, pela vimentina. E em F, a expressão da proliferação das células do saco vitelino visceral, predominando a marcação no tecido conjuntivo (TC). Barras = 50 µm.

No 22º dia, a placenta corioalantoica apresenta-se de forma mais madura, identificando todos os componentes do saco vitelino que estiveram presentes até o fim da gestação. Macroscopicamente, o saco vitelino é a membrana mais externa, apresentando pequenos vasos centralizados em desenvolvimento –os vasos fetais– (Figura 10 A). O saco vitelino pode ser dividido em três tipos: o parietal, uma superfície que recobre a placenta corioalantoica, o visceral viloso, que apresenta projeções localizadas próximas à margem placentária, e o visceral, membrana delgada distante da placenta sem projeções que abrangem a maior parte da superfície fetal.

Microscopicamente, o saco vitelino parietal recobre a margem do disco placentário com uma camada de endoderma em crescimento e estes, com inúmeras projeções, sustentadas pela membrana de Reichert (Figura 10 B). As diferenças entre as projeções se intensificam entre as faces da placenta, permanecendo maiores na face fetal (Figuras 10 B e C) e menores na materna (Figura 10 D). Na imunohistoquímica para proliferação celular, nota-se a marcação das projeções do saco vitelino parietal com predominância no ápice das projeções, em ambas as faces (Figuras 10 C e D). A imunoexpressão da citoqueratina obteve reações no endoderma do saco vitelino parietal, reagindo, na sua maior predominância, nas extremidades das projeções nas duas faces, há acréscimo da marcação positiva da membrana de Reichert.

Figura 10 - Fotomacroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 22º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, imagem macroscópica dos anexos embrionários, evidenciando o útero (Ute), a placenta corioalantoica (Pla) e o saco vitelino visceral (SVVI), com a presença de vasos que margeam –os vasos fetais (VF)–. A Barra = 1 cm. Em B, a face fetal, com inúmeras projeções do saco vitelino parietal (SVP), sustentado pela membrana de Reichert (MR); com a presença da placenta corioalantoica (Pla) e o espaço sanguíneo materno (ESM). Coloração: Hematoxilina e Eosina. B = 50 µm. E em C e D, as imunoexpressões da proliferação celular na face fetal (C) e materna (D), com reação no saco vitelino parietal (SVP), que é mantido pela membrana de Reichert (MR) sobre a placenta corioalantoica (Pla); nota-se a diferença entre o tamanho das projeções entre as faces, sendo maiores na face fetal (C) e menores na materna (D). C e D = 50 µm.

O saco vitelino visceral viloso apresenta diversas vilosidades em direção à face materna e são ricamente vascularizadas por vasos fetais e capilares (Figura 11 A). Essas vilosidades são sustentadas internamente por um eixo de tecido conjuntivo e, externamente, a presença de um tecido epitelial, com células colunares, possui inúmeros vacúolos refringentes na porção basal e inúmeras projeções citoplasmáticas.

Com o uso da técnica da histoquímica com ácido periódico de Schiff (P.A.S.), nota-se a presença de glicoproteínas no tecido conjuntivo, membrana basal, superfícies apical e externa do endoderma das vilosidades (Figura 11 B).

Nas imunohistoquímicas da proliferação celular e da citoqueratina, observam-se reações predominantes nos ápices das vilosidades, sendo que o primeiro anticorpo marca os

núcleos das células epiteliais do endoderma, endoteliais do tecido conjuntivo (Figura 11 C), e o segundo apenas o citoplasma das células epiteliais (Figura 11 D). As células endoteliais são marcadas pela vimentina.

O saco vitelino visceral apresenta uma variação no seu epitélio de acordo com a região analisada. Nas áreas mais afastadas da placenta, o epitélio é pavimentoso e, próximo da placenta, o epitélio é colunar com poucas projeções citoplasmáticas. Na histoquímica do P.A.S., encontra-se uma intensa marcação da membrana basal e da porção apical das células epiteliais (Figura 11 E). A imunoexpressão da proliferação celular, no saco vitelino visceral, ocorre com a predominância da reação nas células do tecido conjuntivo e mesotélio (Figura 11 F).

Figura 11 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral longe da placenta, no 22º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, visão panorâmica do saco vitelino visceral viloso (SVVVo), da placenta corioalantoica (Pla) e do anel fibrovascular (AFV). Coloração: Hematoxilina e Eosina. A Barra = 100 µm. Em B, a histoquímica com ácido periódico de Schiff (P.A.S.), no saco vitelino visceral viloso, marcando as glicoproteínas no tecido conjuntivo (TC) (setas claras), nas superfícies externas dos vilos e no ápice das células do endoderma (End) (setas escuras). B = 50 µm. Em C e D, as imunolocalizações da proliferação celular e da citoqueratina no saco vitelino visceral viloso, respectivamente, com as reações das extremidades das vilosidades; além de identificar o endoderma (End), o endotélio (Ent) e os vasos fetais (VF). C e D = 50 µm. Em E, a histoquímica do P.A.S. no saco vitelino visceral, longe da placenta, identifica as glicoproteínas na membrana basal (setas claras) e ápice das células epiteliais (setas escuras). E = 50 µm. E em F, a imunoexpressão da proliferação celular no saco vitelino visceral, distante da placenta, reagindo no endotélio (Ent) dos vasos fetais (VF) no tecido conjuntivo (TC) e mesotélio (Met), além de observar algumas marcações no endoderma (End). F = 50 µm.

Na microscopia eletrônica de transmissão, o endoderma parietal possui células poliédricas (Figuras 12 A, D e F) com projeções nítidas (Figuras 12 A, D e E), e são acompanhadas pelo tecido conjuntivo, formando uma estrutura semelhante a uma árvore (Figuras 12 B e E). Esse grupo de células endodérmicas se torna proeminente na superfície placentária, com protusões bem delimitadas. As concentrações de nucleócitos plasmáticos são altas, com nucléolo facilmente identificado no núcleo. A superfície dessas células apresentam moderadas microvilosidades. São comuns microfilosidades na superfície apical das células do endoderma (Figuras 12 A, B, D e F). As junções, nas bordas laterais, são complexas com membranas tortuosas, apresentando vários pontos desmosomos (Figuras 12 D e F).

O citoplasma é amplamente ocupado pelo núcleo, o que compromete o crescimento das organelas. O retículo endoplasmático é pouco desenvolvido, sendo constituído de poucas cisternas de retículo granular e agrunular. O complexo de Golgi não é proeminente e representa várias cisternas associadas às vesículas.

A membrana de Reichert separa o endoderma da camada subjacente do trofoblasto; membrana extremamente fina, com algumas fibras colágenas presentes e relacionam-se com o trofoblasto (Figuras 12 A, B, C e D).

Figura 12 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 10 B do saco vitelino parietal, no 22º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, o endoderma (End) do saco vitelino parietal, sendo sustentado pela membrana de Reichert (MR), e esta, por sua vez, relaciona-se com o trofoblasto (Trof). As células endodérmicas apresentam grandes projeções citoplasmáticas (Proj), inúmeros nucleólos no núcleo (setas claras) e, em sua borda apical, a presença de microvilosidades (seta escura). Em B, maior aumento da região basal da árvore endodérmica, mostrando o início das projeções do endoderma (End), sustentado por um tecido conjuntivo (TC). Em C, identifica-se uma grande quantidade de retículo endoplasmático granuloso, na região basal do citoplasma (seta clara). Observam-se, também, as junções intercelulares (seta escura). Em D, o núcleo da célula endodérmica (End), abrangendo a maior área do citoplasma. Em E, as projeções (Proj) das células endodérmicas (End) são suportadas pelo tecido conjuntivo (TC). E em F, as complexas intergitações (setas claras) das células endodérmicas (End). A, B, E e F Barras = 5 μ m, C e D = 2 μ m.

O saco vitelino visceral viloso, ultraestruturalmente, apresenta um endoderma com células colunares e intenso contato lateral entre elas. A borda livre possui células com

aparência festonada (recortada) (Figura 13 A). Na superfície apical possui numerosos prolongamentos citoplasmáticos e microvilosidades (Figuras 13 A, B e C). As junções citoplasmáticas apresentam inúmeros desmosomos, com complexas interdigitações.

O núcleo está na posição central do citoplasma, geralmente, apresentando um nucleólo. O citoplasma é amplamente ocupado por vesículas, em geral refringentes, localizadas na porção basal (Figura 13 D). Já a porção apical contém invaginações saculares de vesículas e vacúolos (Figura 13 C) que se relacionam com as microvilosidades.

A membrana basal encontra-se delgada e, logo abaixo, observam-se inúmeros vasos fetais desenvolvidos (Figuras 13 A, B e D).

Figura 13 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 11 A do saco vitelino visceral viloso, no 22º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, o epitélio colunar com intenso contato entre as células endodérmicas (End) e, no ápice, a presença de célula festonada (seta escura). Identifica-se, ainda, a membrana basal (MB) e o vaso fetal (VF). Em B, a relação do vaso fetal (VF), com o núcleo de uma célula endotelial (seta clara) e a membrana basal (seta escura), sustentando o endoderma (End). Em C, as células endodérmicas (End) apresentam o núcleo em posição central no citoplasma, sendo este último ocupado por inúmeras vesículas, entre elas as refringentes (seta clara), que se relacionam com as microvilosidades na borda apical (setas escuras). E em D, um grande vacúolo lipídico (seta escura) na porção basal da célula endodérmicas (End), que se relaciona com uma fina membrana –a membrana basal (MB)–; observa-se, também, o vaso fetal (VF). A Barra = 10 μ m, B, C e D = 5 μ m.

O saco vitelino visceral, longe da placenta, apresenta uma única camada de células endodérmicas colunares, com núcleo oval bem delimitado pelo citoplasma, contendo, no seu interior, vários nucléolos (Figuras 14 A e B). Porém, em determinadas porções, o endoderma sofre estratificação.

O citoplasma encontra-se preenchido por numerosas vesículas, vacúolos e gotículas citoplasmáticas, com o predomínio de vesículas condensadas na porção apical (Figura 14 A) e de largos vacúolos com estruturas refringente na porção basal (Figuras 14 A e B). O complexo de Golgi é encontrado, geralmente, na posição supranuclear. E os retículos endoplasmáticos granular (Figura 14 E) e agranular são localizados ao longo do citoplasma, com o alto desenvolvimento do granular, na porção basal do citoplasma.

As junções intercelulares estão bem estabelecidas, caracterizando junções complexas (Figura 14 B), de bordas laterais menos tortuosas, tendendo a uma reta, com a presença de desmosomos nas margens laterais das células (Figura 14 F).

Na borda apical, encontram-se inúmeras microvilosidades que estão associadas à exocitose das vesículas (Figura 14 E).

Observa-se que a membrana basal é delgada e, no tecido conjuntivo, encontra-se, usualmente, pequena quantidade de vasos fetais, situados adjacente à membrana basal do endoderma (Figura 14 B). Entretanto, em algumas regiões pode-se observar a ausência do tecido conjuntivo (Figura 14 A).

Figura 14 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 11 F do saco vitelino visceral, no 22º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A-D, visualizam-se a presença de um endoderma colunar (End) e células com grandes vacúolos refringentes (setas claras) na porção basal do citoplasma, e, na apical, vesículas condensadas (setas escuras); observam-se também as microvilosidades (MV). Em especial, em B as junções intercelulares (JIC) são aparentes; e em B, C e D há íntima relação da membrana basal (MB) com o vaso fetal (VF) e o núcleo da célula endotelial (CE). Na figura 14 E, as células endodérmicas (End) apresentam o retículo endoplasmático agranular (seta clara) e a exocitose de uma vesícula (seta escura) se relacionando com as microvilosidades (MV). E na figura 14 F, as junções intercelulares se tornam menos tortuosas (seta escura) e, em alguns pontos, podem-se observar os desmosomos (seta clara). A, C e D Barras = 5 μ m, B = 10 μ m, E = 2 μ m e F = 2,5 μ m.

No 30º dia, observa-se o desenvolvimento da vascularização do saco vitelino com moderados vasos fetais que se iniciam a ramificar em direção às margens.

A membrana de Reichert é evidenciada histologicamente mais proeminente e espessada, sustentando o saco vitelino parietal. O endoderma continua se proliferando, porém aumentando a diferença entre as faces da placenta. Essas diferenças são facilmente identificadas com o intenso número de projeções na face fetal (Figuras 15 A e B). A imunomarcagem da citoqueratina é positiva nas células endodérmicas, com reações ao longo das projeções (Figura 15 C). As células endodérmicas apresentam atividades de proliferação celular (Figura 15 D).

Figura 15 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos parietal, no 30º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A e B, a diferença na proliferação das projeções do endoderma do saco vitelino parietal (SVP) se tornam mais acentuadas entre as diferentes faces da placenta corioalantoica (Pla), sendo que, em A, a face materna com menor número de projeções e a situação contrária é visualizada em B, na face fetal; observa-se ainda a espessa membrana de Reichert (MR) e mantém o endoderma do saco vitelino parietal. Colorações: Hematoxilina e Eosina. Em C, a imunomarcagem da citoqueratina no saco vitelino parietal (SVP), com predomínio da reação ao longo das projeções. E em D, a imunoexpressão do PCNA com reação nos núcleos celulares do endoderma do saco vitelino parietal (SVP); além de identificar a placenta corioalantoica (Pla) e o espaço sanguíneo materno (ESM). Barras = 50 µm.

O saco vitelino visceral viloso encontra-se bem desenvolvido, apresentando diversos vilos em direção materna. Juntamente com o crescimento do endoderma, o tecido conjuntivo acompanha-o, sustentado as vilosidades e possui um epitélio prismático, com grandes

vacúolos refringentes, predominantes na porção basal e inúmeras projeções citoplasmáticas. Na imunomarcagem, utilizando a vimentina, encontram-se a reação das células endoteliais e do tecido conjuntivo (Figura 16 A). Na expressão da proliferação celular, a reação ocorreu em todas as camadas com o predomínio nos núcleos das células endodérmicas (Figuras 16 B e C).

O saco vitelino visceral apresenta uma variação nas células epiteliais do endoderma conforme a sua localização. Quando distante da placenta, apresenta um epitélio simples colunar alto e, próximo da placenta, as mesmas características epiteliais foram observadas, com projeções citoplasmáticas semelhantes às visualizadas no endoderma do saco vitelino visceral viloso (Figura 16 D). A expressão da proliferação celular ocorreu nos vasos fetais, células epiteliais e endotelial e tecido conjuntivo.

Figura 16 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral, no 30º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, imagem panorâmica do saco vitelino visceral viloso (SVVVo) na imunolocalização da vimentina marca os vasos fetais (setas). A Barra = 200 µm. Em B e C, as reações da proliferação celular, localizando os núcleos das células endodérmicas e do tecido conjuntivo (TC). B = 200 µm e C = 50 µm. E em D, o saco vitelino visceral, localizado longe à margem da placenta, apresenta um endoderma (End) com células epiteliais colunares altas e projeções (Proj), sobre uma camada de tecido conjuntivo (TC) com vasos fetais (VF). Coloração: Hematoxilina e Eosina. D = 50 µm.

No 40º dia, o saco vitelino possui grandes vasos fetais centralizados, dos quais partem inúmeras ramificações menos calibrosas em direção às margens. Nesse estágio gestacional, é possível distinguir o saco vitelino visceral, distante da placenta, e o visceral viloso, próximo da placenta, através da diferença de opacidade entre as membranas (Figura 17 A).

Na análise histológica, as estruturas atingem o seu máximo desenvolvimento. A membrana de Reichert encontra-se bastante espessada, constituída de material amorfo que confere o suporte, para o saco vitelino parietal. A diferença entre as faces da placenta continua e, com uma maior quantidade de projeções e tamanhos. Porém, a face materna (Figura 17 B) apresenta, ainda, menores projeções, quando comparada à face fetal (Figura 17 C). Na histoquímica do P.A.S., observa-se que as glicoproteínas estão localizadas na membrana de Reichert, ápice e extremidades das projeções do saco vitelino parietal, em ambas as faces (Figuras 17 B e C). A identificação da proliferação celular esteve presente nas projeções do saco vitelino parietal, sendo que a reação predominou no ápice dessas estruturas, independente da face.

Figura 17 - Fotomicroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 40º dias de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, imagem macroscópica dos anexos embrionários, evidenciando o útero (Ute), a placenta corioalantoica (Pla), o saco vitelino visceral viloso (SVVVo), saco vitelino visceral (SVVI) e os vasos fetais (VF). Barra = 1 cm. E em B e C, as histoquímicas, com ácido periódico de Schiff (P.A.S.), nas faces materna (B) e fetal (C), evidenciam as glicoproteínas na membrana de Reichert (MR) (setas claras), nas porções apicais e das extremidades das células do saco vitelino parietal (SVP) (setas escuras). B e C = 50 µm.

O saco vitelino visceral viloso encontra-se com inúmeros vilos, com vilosidades longas em direção materna, o endoderma ocupa amplamente a área vilosa, levando a uma redução do tecido conjuntivo; o seu epitélio é prismático alto com diversas projeções citoplasmáticas (Figura 18 A). Na análise da imunoexpressão da proliferação celular, identifica-se a marcação positiva, prevalecendo nas células endodérmicas (Figura 18 B). A vimentina reage nas células endoteliais, localizadas no tecido conjuntivo, como a citoqueratina no ápice das células endodérmicas. Na histoquímica com ácido periódico de Schiff, nota-se que o saco vitelino visceral viloso apresenta glicoproteínas no tecido conjuntivo, membrana basal, superfícies ápical e externa das células endodérmicas (Figura 18 C).

O saco vitelino visceral, distante da placenta, possui, em sua extensão, um epitélio colunar; porém, em uma pequena área, pode se observar que o endoderma apresenta estratificação (Figura 18 D). Com a histoquímica com P.A.S., observa-se a diferença de glicoproteínas entre as regiões do saco vitelino visceral. Na região localizada, próxima à placenta, houve a marcação da membrana basal, do ápice e das extremidades das células endodérmicas (Figura 18 E). Já na região distante da placenta, a expressão do P.A.S. ocorre de uma forma mais intensa nas regiões anteriormente citadas (Figura 18 F).

Figura 18 - Fotomicroscopias dos sacos vitelinos, visceral viloso e visceral, no 40º dias de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, imagem panorâmica do saco vitelino visceral viloso (SVVVVo), sendo constituído pelo mesotélio (Met), o tecido conjuntivo (TC) e o endoderma, com inúmeras projeções citoplasmáticas (setas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. A Barra = 100 µm. Em B, a imunorreacção da proliferação celular com a marcação das células endodérmicas (setas). Além de se observar o mesotélio (Met) e o tecido conjuntivo (TC). B = 200 µm. Em C, na histoquímica com ácido periódico de Schiff (P.A.S.) evidenciam-se as glicoproteínas na membrana basal (setas claras), ápice e extremidades das células endodérmicas do saco vitelino visceral viloso. C = 50 µm. Em D, o saco vitelino visceral, longe da placenta, apresenta diferença na constituição do endoderma (End), com um epitélio colunar e, em outra região, com estratificação. Notar a presença das projeções citoplasmáticas (seta). D = 50 µm. E em E e F, as histoquímicas com ácido periódico de Schiff (P.A.S) na região próxima (E) e longe da placenta (F), observando, na primeira região, uma reacção na membrana basal (setas claras), ápice e extremidades das células endodérmicas (setas escuras). Entretanto, na segunda região, observa-se intensa marcação das estruturas anteriormente citadas. Além de identificar o mesotélio (Met), tecido conjuntivo (TC) e vasos fetais (VF). E e F = 50 µm.

Na microscopia eletrônica de transmissão, o endoderma parietal apresenta intensas projeções citoplasmáticas (Figuras 19 C e D). O retículo endoplasmático se distribui ao longo do citoplasma, sendo o granular presente na região perinuclear (Figura 19 A), com a presença de cisternas paralelas, enquanto que a agrunalar é periférico com estruturas semelhante a túbulos.

As células endodérmicas encontram-se fragmentadas (Figura 19 D), apresentando inúmeros microvilosidades na borda apical, e o núcleo possui uma quantidade reduzida de nucleócitós (Figura 19 C). As junções intercelulares são mais elaboradas, com o desenvolvimento de material fibrilar no citoplasma, associando-as (Figuras 19 A e B). A membrana de Reichert encontra-se espessada e com material acelular proeminente de numerosas fibras colágenas (Figura 19 B).

Figura 19 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 17 C do saco vitelino parietal, no 40º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, observa-se o retículo endoplasmático granular (seta clara) nas células endodérmicas (End) e, unindo essas células às junções intercelulares mais elaboradas (setas escuras), além de identificar a membrana de Reichert (MR). A Barra = 5 μ m. Em B, maior aumento, mostrando o espessamento da membrana de Reichert (MR) e sua constituição através de inúmeras fibras colágeno. B = 10 μ m. Em C, nota-se a pequena quantidade de nucleócitós (setas escuras) no endoderma (End). C = 10 μ m. E em D, a fragmentação das células endodérmicas (End). D = 10 μ m.

O saco vitelino visceral viloso apresenta um endoderma com células colunares altas e algumas áreas que evidenciam estratificação (Figuras 20 A e B). Na superfície apical, possui poucos prolongamentos citoplasmáticos e microvilosidades (Figura 20 D).

Na região basal do citoplasma, há presença de grandes vacúolos e vesículas refringentes (Figura 20 C) e, na apical, a predominância de vacúolos condensados (Figuras 20 D e F) em íntima relação com as microvilosidades (Figura 20 D); acrescenta-se a relação das mitocôndrias com as extremidades das células.

As junções intercelulares não se apresentam de forma intensa (Figuras 20 B e F), como observado anteriormente, mas ainda se encontram desmosomos (Figura 20 C). A membrana basal está condensada com material fibrinóide (Figuras 20 C e E) e, logo abaixo, no tecido conjuntivo, a presença de inúmeros vasos fetais abaixo dela (Figura 20 E).

Figura 20 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 18 A do saco vitelino visceral viloso, no 40º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, o endoderma (End) do saco vitelino visceral viloso apresenta mais de uma camada. A Barra = 10 µm. Em B, maior aumento do endoderma estratificado, mostrando que as junções intercelulares não são intensas (setas claras). B = 5 µm. Em C, a predominância dos vacúolos refringentes (seta clara) na porção basal das células endodérmicas (End) e a presença de desmosomos (seta escura), além de identificar a membrana basal (MB). C = 2 µm. Em D, a relação dos vacúolos condensados (setas claras) com as projeções citoplasmáticas e microvilosidades (seta escura). D = 2 µm. Em E, a relação da luz do vaso fetal (VF) com a membrana basal (MB). E = 5 µm. E em F, a presença de vacúolos condensados na porção apical da célula (setas claras) e as junções intercelulares tornam-se menos tortuosas. F = 5 µm.

O saco vitelino visceral, longe da placenta, continua como uma única camada de células endodérmicas colunares, porém com o núcleo oval, ocupando grande parte do citoplasmama e com pouca condensação de sua cromatina (Figura 21 A).

O citoplasma está preenchido por poucos vacúolos, predominando na porção basal estruturas refringentes, extremamente grandes (Figura 21 A) e condensadas na apical (Figura 21 C). A presença de microvilosidades e projeções citoplasmáticas encontram-se reduzidas (Figuras 21 A, C e D) com a íntima relação dessas com os vacúolos (Figura 21 C).

O complexo de Golgi é encontrado geralmente na posição supranuclear, também sendo encontrado lateralmente ao núcleo. E os retículos endoplasmáticos granular e agrunular estão presentes ao longo do citoplasma, com o alto desenvolvimento do granular na porção basal do citoplasma (Figura 21 B).

As junções intercelulares não se estabelecem de forma intensa e apresentam bordas, tendendo a uma reta (Figura 21 B). Há pouca presença de desmosomos nas margens laterais das células.

A membrana basal da camada endodérmica apresenta-se condensada, com característica de material fibrinóide no seu interior (Figuras 21 A, B e D). No tecido conjuntivo, encontra-se, usualmente, grande quantidade de vasos fetais situados adjacentes à membrana basal do endoderma (Figuras 21 B e D).

Figura 21 - Eletromicrografias de transmissão referentes à figura 18 F do saco vitelino visceral, no 40º dia de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, o endoderma (End) apresenta células colunares com o núcleo pouco condensado e grandes vacúolos refringentes (setas claras) na porção basal do citoplasma; com uma proeminente membrana basal (MB) e microvilosidades (MV). A Barra = 5 μ m. Em B, o retículo endoplasmático granular (setas claras) encontra-se na porção basal e as junções intercelulares não se estabelecem de forma intensa, tendendo a uma reta (seta escura). B = 5 μ m. Em C, a exocitose da vesícula refringente (seta escura), associadas às microvilosidades (MV), além de identificar as vesículas condensadas (setas claras) na porção apical. C = 2 μ m. E em D, visão panorâmica do membrana basal (MB), núcleo da célula endotelial (CE) e do endoderma (End) visceral, com poucas microvilosidades (MV). O retículo endoplasmático granular (seta clara) está na porção basal do citoplasma. D = 5 μ m.

No 55º dia, o saco vitelino possui uma vascularização mais evidente, com vários grandes vasos fetais centralizados, que emitem ramificações, abrangendo todo o território vitelínico (Figura 22 A).

Histologicamente, o saco vitelino parietal reduz drasticamente o seu epitélio de revestimento, tanto na face materna como fetal, o que leva a uma redução da espessura da membrana de Reichert. Na face materna, o epitélio não apresenta projeções e passa a ser classificado como simples colunar; na face fetal, as projeções reduzem de tamanho, ficando semelhantes a um epitélio pseudoestratificado (Figura 22 B). Em ambas as faces, os núcleos das células endodérmicas estão condensados. Na imunoexpressão da proliferação celular, o saco vitelino parietal não apresentou marcação (Figura 22 B).

O endoderma do saco vitelino visceral, distante da placenta, apresenta-se com uma simples camada de epitélio pavimentoso com os núcleos condensados e uma delgada camada de tecido conjuntivo (Figuras 22 C e D). Na imunolocalização da vimentina, apresenta marcação nos vasos fetais (Figura 22 C). E na imunoexpressão da proliferação celular não se identificam reações entre as estruturas do saco vitelino visceral longe da placenta (Figura 22 D). Porém se observa marcação do endoderma que margeia o anelfibrovascular (Figura 22 E).

Figura 22 - Fotomacroscopia e microscopias dos anexos embrionários, no 55º dias de gestação, de *Cavia porcellus*

Legenda: em A, imagem macroscópica dos anexos embrionários evidencia a placenta corioalantoica (Pla), o saco vitelino visceral viloso (SVVVo), o saco vitelino visceral (SVVI) e os vasos fetais (VF). A Barra = 3 cm. Em B, a imunohistoquímica da proliferação celular, negativa ao saco vitelino parietal (SVP) na face fetal e apresenta um epitélio pseudoestratificado com uma delgada membrana de Reichert (MR) em contato com a placenta corioalantoica (Pla) com espaço sanguíneo materno (ESM). B = 50 µm. Em C, a imunoexpressão da vimentina no saco vitelino visceral, longe da placenta, com reação nos vasos fetais (VF); observa-se, ainda, uma delgada camada de tecido conjuntivo. C = 50 µm. Em D e E, as imunolocalizações do PCNA, com marcação negativa no saco vitelino visceral (SVVI) (Figura 22 D) e a reação apenas no anel fibrovascular (AFV) (Figura 22 E). Além de observar, o endoderma (End), mesotélio (Met) e artéria fetal (AF). D e E = 50 µm.

Discussão

6 DISCUSSÃO

No 9º dia de gestação do guinea pig, foi observada a presença temporária do endoderma do saco vitelino parietal que está voltado para o endoderma do saco vitelino visceral. Os mesmos formam uma cavidade única –o saco vitelino– (OLIVEIRA et al., 2012b e resultados próprios). Diferente do retratado anteriormente por inúmeros autores em *C. porcellus* (por exemplo: KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977), visualizamos resultados semelhantes em *Galea spixii*, mas em datas posteriores, entre o 12º e 13º dia (OLIVEIRA et al., 2012b). Nossos resultados sugerem que os caviomorfos apresentam características morfológicas similares no estágio de blastocisto, porém a diferenciação do saco vitelino ocorre em períodos diferentes, sendo mais precoce no guinea pig e mais tardio no preá. Este fato pode ser comprovado através da completa inversão do saco vitelino, que foi identificada no 11º dia no *Cavia porcellus* (MESS, comunicação pessoal, ver resultados próprios no 12º dia) e no 14º dia no *Galea spixii*. A cavidade do saco vitelino e o saco vitelino parietal estão temporariamente presentes em curto período da gestação, aproveitamos para esclarecer que esses desaparecimentos não afetam o crescimento do saco vitelino visceral em direção ao disco embrionário. Acreditamos que essas estruturas não foram identificadas pelos estudos anteriores (PERROTTA, 1959; TIBBIS; HILEMANN, 1959; HILLEMANN; GAYNOR, 1961; CARTER et al., 1998; BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MESS, 2007a; MIGLINO et al., 2008; FLAMINI et al., 2011), pois se restringiram a outras fases da gestação, e não à implantação embrionária (OLIVEIRA et al., 2012a,b); portanto propomos a presença dessas estruturas nos outros caviomorfos e são necessários estudos mais específicos para a sua comprovação. Em adição nós propomos que seja necessária uma mudança da nomenclatura em relação ao saco vitelino parietal, pois, na implantação embrionária, esse termo refere-se ao saco vitelino longe da placenta e não ao saco vitelino que recobre a placenta durante as outras fases. Assim, sugere-se a denominação de saco vitelino da placenta ou placentário (OLIVEIRA et al., 2012b). Será utilizada a nova nomenclatura para a descrição dessa estrutura.

Em geral, o saco vitelino é uma importante rota nos roedores semelhantes ao guinea pig da transferência de proteínas, incluindo anticorpos (LEISSRING; ANDERSON, 1961; KING; ENDERS, 1970b; WILD, 1975; KING; ENDERS, 1993; ENDERS; CARTER, 2006). Entretanto, os presentes resultados sobre as gestações iniciais contestam essa função. Nos

estágios iniciais da gestação de *Cavia porcellus*, verificou-se a intensa formação e desenvolvimento do saco vitelino entre o 12º-18º dia. A proliferação celular foi identificada ultraestruturalmente e imunohistoquimicamente, a primeira através da cromatina dispersa no núcleo, caracterizando que a célula está em meiose, e a segunda, através da marcação da proliferação celular no endoderma do saco vitelino da placenta e em todas as camadas do saco vitelino longe da placenta corioalantoica, predominando no tecido conjuntivo adjacente ao endoderma. Esse crescimento também pode ser verificado através das imunomarcações da citoqueratina, nos endodermas do anel fibrovascular e do saco vitelino visceral, e da vimentina, identificando a intensa formação de vasos fetais. Resultados semelhantes foram observados nas imunohistiquímicas de outros estágios no guinea pig (CARTER et al., 1998) e do preá (OLIVEIRA et al., 2012b). As outras investigações nos caviomorfos não utilizaram métodos similares nesse período (BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MESS, 2007a; MIGLINO et al., 2008; FLAMINI et al., 2011) ou foram em períodos diferentes (OLIVEIRA et al., 2012a). A predominância da proliferação celular, no tecido conjuntivo do saco vitelino visceral e a marcação sucessiva da vimentina, sugere-se que o saco vitelino não apresenta uma vascularização adequada, para exercer, de forma integral, a sua função de nutrir o embrião nesse período. Foi verificado, ultraestruturalmente, o desenvolvimento precoce dos vasos fetais, sendo preenchido por hemácias nucleadas. Morfologicamente, as organizações dessas células levam a intensas alterações no saco vitelino como: a passagem da pseudoestratificação do endoderma do saco vitelino da placenta (12º-14º dia) para a presença de projeções que partem da placenta corioalantoica semelhantes a uma árvore (16º dia); a identificação precoce (14º dia) de vesículas na porção basal do endoderma do saco vitelino visceral; os primeiros vasos fetais já são observados a partir do 16º dia, preenchidos por hemácias nucleadas; e a formação inicial de vilosidades no saco vitelino visceral próximo à placenta (18º dia). Essas sequências de alterações demonstram que o desenvolvimento do saco vitelino não é específico a uma determinada área e são indicativos do transporte diminuto de substâncias para os fetos ao longo de todo o saco vitelino, na gestação inicial. Em contraste, a placenta corioalantoica está parcialmente desenvolvida na implantação embrionária, onde o cone ectoplacentário está em íntimo contato com o sistema sanguíneo materno, no 9º dia, no guinea pig (MESS et al., 2012) e na implantação embrionária no *Thrichomys laurentinus* (OLIVEIRA et al., 2012a). Em adição com diversas citações (KING, 1982; MOSSMAN, 1987; WOLF, et al., 2003; RIVEROS, 2009), propomos que a placenta corioalantoica é de

extrema importância nos caviomorfos, para a manutenção dos nutrientes do embrião na fase inicial da gestação, pois a sua formação antecede a do saco vitelino.

Estruturalmente houve uma mudança no revestimento do saco vitelino sobre a placenta corioalantoica entre o 12º e o 16º dia. O envoltório, que era anteriormente compreendido por uma pseudoestratificação, passou por uma reorganização celular em suas camadas até formar projeções, estruturas que se assemelham a uma árvore. Diferente dos relatos anteriores que descreviam esse revestimento em forma de várias camadas (KING, 1971; OLIVEIRA et al., 2006; MESS, 2007a; MIGLINO et al., 2008; FLAMINI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012a,b) ou através de um epitélio simples colunar (CARTER et al., 1998; BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; KANASHIRO et al., 2009), de acordo com a fase gestacional de outros roedores. Acrescentamos, ainda, que o crescimento do saco vitelino placentário, no *Cavia porcellus*, variou conforme sua localização na placenta corioalantoica, apresentando maior crescimento na face fetal do que na materna (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977) e que houve a imunomarcagem da citoqueratina, na porção apical dessas células. Esta marcação mostra a intensa movimentação do citoesqueleto na porção apical, consequentemente há uma intensa transferência de nutrientes (KING, 1971) como foi demonstrado ultraestruturalmente no 16º dia, da presença de vesículas e vacúolos, refringentes e condensados, que estarão presentes de forma semelhante na gestação média, relacionando-se com as microvilosidades dessa região. Além disso, a diferença das projeções do endoderma é explicada pela sua relação de distância entre elas com o feto, ou seja, quanto mais próximo do feto (superfície fetal) maior será a espessura do epitélio do saco vitelino e maior será a necessidade da transferência de nutrientes, e quanto mais distante (superfície materna) menor a sua espessura e mais difícil de carrear esses nutrientes ao feto. Dessa forma, esses resultados explicam a hipótese de que a placenta corioalantoica é muito importante, para a nutrição do embrião no início da gestação, mas também inclui o saco vitelino da placenta como importante carreador de substância nesse período. Em adição, sugerimos, ainda, que, além da nutrição hemotrófica da placenta, pode ocorrer a nutrição histotrófica derivada das glândulas uterinas.

A membrana de Reichert não foi identificada no 12º dia de gestação, mas, sim, um espaço que separa a placenta corioalantoica do saco vitelino da placenta que está preenchido de material extracelular e de vacúolos; essa membrana está presente somente a partir do 16º dia, com o desenvolvimento da gestação, se torna cada vez mais espessa, sendo constituída de material amorfo e acelular, imunolocalizada pela citoqueratina. Funciona como um alicerce

do saco vitelino da placenta. Acreditamos que esse espaço o qual abrigava o material extracelular foi preenchido pela membrana de Reichert. Dessa forma, esses resultados são análogos aos obtidos no rato, camundongo (WISLOCKI; PADYCUA, 1953; KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977) e caviomorfos em geral (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977; BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MESS, 2007a,c; MIGLINO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012a,b) que verificaram que a membrana é acelular. Entretanto, a presença de poucas células na membrana de Reichert, também, foi verificada por Carter et al. (1998) em *Cavia porcellus*, Kanashiro et al. (2009) em *Hydrochaeris hydrochaeris* e Flamini et al. (2011) em *Lagostomus maximus*. Além disso, Carter et al. (1998) acrescentaram que, através da imunohistoquímica no 35º e 40º dia, em guinea pig, a membrana de Reichert é localizada pela vimentina e não da citoqueratina; que mostram a expressão de filamento intracelularmente e diversos núcleos orientados paralelamente à superfície da placenta. Assim, o epitélio do saco vitelino descansa sobre uma camada de células mesenquimais que não são análogas à membrana de Reichert descrita anteriormente. Acreditamos que essas diferenças nas marcações ao longo da membrana de Reichert foi devido a divergência entre as marcas e as concentrações do anticorpo da vimentina. Obviamente, existem algumas variações no caviomorfos, em especial no guinea pig que acreditamos que devem ser mais bem estudadas.

O auge da transferência de nutrientes ao feto do guinea pig encontra-se entre o 22º e o 40º dia, em particular no 40º dia, como pode ser verificado através das análises estrutural, histoquímica, imunohistoquímicas e ultraestrutural, como exemplo através da fragmentação do endoderma parietal resultante da grande transferência de líquidos (MESS, 2007a; MIGLINO et al., 2008). Mas, morfológicamente, o saco vitelino não formará novas estruturas nesse período, e, sim, o desenvolvimento dessas já existentes (BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MESS, 2007a; MIGLINO et al., 2008), visando maximizar a transferência de nutrientes. Fato que pode ser plenamente identificado através das análises imunohistoquímicas da citoqueratina, vimentina e proliferação celular, no qual o primeiro marcador identifica a constante movimentação das extremidades do citoesqueleto dos endodermas dos sacos vitelinos da placenta e visceral, e da membrana de Reichert; o segundo marca o surgimento e o desenvolvimento dos vasos fetais no saco vitelino visceral, semelhante a Carter et al. (1998) e a Flamini et al. (2011); e o terceiro localiza a proliferação em todas as camadas do saco vitelino porém com o predomínio do endoderma, similar a Oliveira et al. (2012a), e não mais do tecido conjuntivo, como observado no estágio inicial.

Essas sequências de fatos mostram que a “base” do saco vitelino, o tecido conjuntivo e os vasos fetais, já estão formados e que ele está maduro o suficiente para o desenvolvimento do endoderma, visando assim exercer sua principal função –a transferência de nutrientes para o feto–. Como foi verificado pelo intenso transporte de glicoproteínas no tecido conjuntivo ou membrana basal, superfície apical e porção externa das células endodérmicas, sugestiva de ativa glicosilação no processo de síntese, absorção ou secreção, similares a Miglino et al. (2008); Kanashiro et al. (2009) e Oliveira et al. (2012a). Dessa forma, o saco vitelino prioriza o crescimento do endoderma como pode ser verificado ultraestruturalmente através do extenso e sequencial desenvolvimento das organelas, em especial dos retículos endoplasmáticos, granular e agranular (KING; ENDERS, 1970c), do maior número de vesículas e vacúolos refringentes (porção basal) e condensados (porção apical) no citoplasma (BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al. 2006, 2012a). Acrescentamos, ainda, a grande proximidade entre os vasos fetais com a membrana basal do endoderma visceral. Sugerimos que essa íntima relação seja para facilitar o transporte de substâncias entre o endoderma e o vaso fetal, reduzindo, ao máximo, o número de camadas por onde será transportado o nutriente, nesse caso o tecido conjuntivo. Essas características propõem a intensa troca de nutrientes, tanto pela endocitose (DEMPSEY, 1953; KING; ENDERS, 1970c; KING; TIBBITTS, 1976; BONATELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006, 2012a) como pela exocitose (OLIVEIRA et al., 2012a), através da glicosilação no processo de síntese, absorção ou secreção, conforme observado em outros caviomorfos (MIGLINO et al., 2008; KANASHIRO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012a).

A redução drástica das estruturas do saco vitelino foi observada no último terço da gestação do *Cavia porcellus*. Nesse período, várias alterações degenerativas são aparentes (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961) entre elas a descontinuidade do endoderma da placenta (BJELLIN; SJÖQUIST; CARTER, 1975; CARTER et al., 1998) com a redução de sua espessura, passando de inúmeras grandes projeções, para uma pseudoestratificação na face fetal ou um epitélio simples colunar na face materna. Essa redução do endoderma leva a uma limitação subsequente da espessura da membrana de Reichert. O saco vitelino visceral alterou o seu revestimento, para o epitélio pavimentoso. Essa involução também foi visualizada nas imunohistoquímicas com a não marcação intensa da citoqueratina no endoderma, similar a Carter et al. (1998) e da proliferação celular nas camadas do saco vitelino. E a pouca marcação da vimentina nos vasos fetais. Esses resultados podem sugerir

que o guinea pig é similar a outros caviomorfos, mas os autores não fazem referência específica a esse período.

Como os nossos resultados são muito extensos, optamos por colocá-los junto às citações de outros autores do guinea pig (Quadro 1).

Quadro 1 – Importância do desenvolvimento no *Cavia porcellus* - São Paulo - 2012

Tempo	O que acontece?	Autor (es)
6 a 12 horas	. Fertilização do oócito;	Pytler; Strasser (1925)
4º ao 5º dia	. Implantação do oócito, fertilizado no útero, é no estágio de mórula ou blastocisto inicial;	Bischoff (1852); Hensen (1876, 1883); Herrmann; Stolper (1904, 1905); Disse (1905); Amoroso (1952)
6º dia	. A mórula inicia a penetração no útero;	Próprios resultados
7º dia	. O blastocisto continua a penetração até que a mucosa do útero se feche, recobrindo-o;	Próprios resultados
6º ao 7º dia	. Implantação;	Kaufmann; Davidoff (1977)
8º dia	. Início da diferenciação das células da camada interna, voltada à cavidade do blastocisto; . Análogo a outros roedores, a camada do endoderma superficial é denominada de saco vitelino visceral; . Somente a estrutura visceral do saco vitelino é formada; . A cavidade do saco vitelino não existe nesse estágio do desenvolvimento;	Kaufmann; Davidoff (1977)
	. O blastocisto inicia a diferenciação das suas camadas que originará o cone ectoplacentário, oriundo da invasão do polo mesometrial, e o disco embrionário, pelo polo antimesometrial.	
9º dia	. O mesoblasto extraembrionário entre o embrioblasto e o saco vitelino visceral continua crescendo até que ambos são separados completamente; . A camada visceral do saco vitelino cresce ao longo do cone ectoplacentário, assim perdendo a relação com a decídua materna;	Kaufmann; Davidoff (1977)
	. Com o desenvolvimento das camadas do blastocisto, forma-se, inicialmente, o endoderma que reveste a cavidade do blastocisto, constituída por uma camada interna precursora do saco vitelino visceral e outra externa do saco vitelino parietal;	
9º dia e meio	. A extensão do mesoderma cresce para fora da zona marginal entre o saco amniótico e o saco vitelino, para o cone ectoplacentário;	Kaufmann; Davidoff (1977)
11º dia	. O saco vitelino parietal desaparece, sem afetar o desenvolvimento do saco vitelino visceral, em direção ao disco embrionário. Dessa forma, leva ao desaparecimento consequente da cavidade do saco vitelino;	Mess (comunicação pessoal)
	. Início da diferenciação das células da camada interna, voltada à cavidade do blastocisto;	Amoroso (1952); Starck (1975)

12º dia	. O endoderma intestinal se destaca do epitélio do saco vitelino;	Kaufmann; Davidoff (1977)
	. Observa-se o desenvolvimento inicial da placenta corioalantoica e do saco vitelino, esse último podendo distinguir o saco vitelino parietal (placenta) do visceral; . O endoderma parietal está disposto na forma de camadas, no qual apresenta proliferação celular através da cromatina dispersa no citoplasma. As células endodérmicas apresentam, em seu citoplasma, vesículas e gotículas refringentes e o retículo endoplasmático granular. Essa última organela varia sua disposição conforme a camada. Quando mais próximo da placenta sua organização é perinuclear e quando próximo ao lúmen se restringe na porção apical; porção que não apresenta microvilosidades. As células são separadas por fracas junções intercelulares e separando o endoderma da placenta, há presença de um espaço preenchido por material extracelular e vacúolos; . O endoderma do saco vitelino visceral já está voltado em direção uterina, o que caracteriza sua inversão, sendo classificada como epitélio colunar. Na camada abaixo do endoderma, identifica o desenvolvimento inicial dos vasos fetais. Ultraestruturalmente apresenta condições semelhantes ao endoderma parietal, com a cromatina dispersa no núcleo caracterizando a meiose, vesículas e gotículas refringentes, o retículo endoplasmático granular está localizado na porção apical e sem a presença de microvilosidades; sustentando essas células encontra-se uma membrana basal consolidada;	Próprios resultados
14º dia	. A placenta corioalantoica apresenta a forma inicial de um disco e, envolvendo-a, um saco vitelino parietal mais estratificado, que reagiu positivamente à citoqueratina; . A distinção de todas as camadas do saco vitelino visceral, constituída por um endoderma com epitélio simples colunar e a presença de vesículas na porção basal, o tecido conjuntivo com a formação de vasos fetais e o mesotélio subjacente. Imunohistoquimicamente, a primeira camada localiza-se pela citoqueratina e a segunda pela vimentina; . Já se identifica o anel fibrovascular com capilares, que envolve a artéria e a veia fetais, em íntima relação com o saco vitelino visceral;	Próprios resultados
15º dia	. A fusão do epitélio do saco vitelino com a placenta formará cada vez mais uma superfície mais extensa, voltada à superfície fetal da placenta; . Essa considerável extensão do saco vitelino parietal leva a uma intensa formação de vilosidades próxima à margem placentária;	Kaufmann; Davidoff (1977)
	. As células, que são homólogas com o endoderma do saco vitelino parietal da placenta madura, apresenta uma camada positiva à citoqueratina; . O endoderma entre os sacos vitelinos, parietal e visceral, é contínuo, sendo que o visceral é uma membrana que compreende a camada externa do endoderma, voltada à cavidade decidual, e a camada interna do mesoderma, voltada ao celoma extraembrionário, são imunomarcadas pela citoqueratina e este último tanto para citoqueratina como para a vimentina;	Carter et al. (1998)
16º dia	. O endoderma parietal deixa de se apresentar na forma de	Próprios resultados

	<p>camadas e passa para a forma de projeções, semelhante às árvores; estruturas que foram localizadas pela proliferação celular. Ultraestruturalmente, além de identificar as projeções, identificam-se também as microvilosidades. O retículo endoplasmático granular encontra-se na porção apical, juntamente com vesículas e grandes vacúolos refringentes; e as junções intercelulares se tornam mais aparentes. A membrana de Reichert encontra-se espessada e constituída de material amorfo;</p> <p>. O saco vitelino visceral forma ligeiras pregas na região próxima à placenta. O endoderma visceral é marcado pela a citoqueratina, a vimentina localiza o tecido conjuntivo, e a proliferação celular reage em todas as camadas, em especial no tecido conjuntivo. Ultraestruturalmente, encontram-se numerosas vesículas, relacionadas com a membrana plasmática e as microvilosidades; em adição o complexo de Golgi com o retículo endoplasmático granular. As interações celulares estão mais nítidas. Abaixo do endoderma, encontra-se a organização dos primeiros vasos fetais, sendo preenchidos por hemácias nucleadas;</p> <p>. A vascularização do anel fibrovascular se torna mais evidente, com a maior quantidade de capilares na sua extremidade;</p>	
17º dia	. A dobragem das vilosidades do epitélio do saco vitelino perto da ligação com a placenta cresce;	Kaufmann; Davidoff (1977)
18º dia	<p>. Identificam-se variações na espessura do endoderma parietal de acordo com a sua localização, sendo que, na região próxima do anel fibrovascular, o endoderma é delgado, constituído por uma camada pouco reativa à citoqueratina; a membrana de Reichert reage à citoqueratina;</p> <p>. No saco vitelino visceral, encontram-se projeções que se localizam próximas à placenta, formando as primeiras vilosidades. Longe da placenta, o endoderma apresenta marcações da citoqueratina e os vasos fetais da vimentina; e a proliferação celular predomina novamente no tecido conjuntivo;</p> <p>. O anel fibrovascular apresenta maior quantidade de tecido conjuntivo, revestindo-o;</p>	Próprios resultados
19º dia	. A vascularização do saco vitelino visceral não é completada até o 19º dia;	Duval (1892)
22º dia	<p>. Todos os componentes que estarão presentes até o fim da gestação são identificados, já sendo possível distinguir do saco vitelino visceral, o saco vitelino visceral viloso e o saco vitelino visceral longe da placenta;</p> <p>. As projeções do endoderma parietal se tornam cada vez maiores, aumentando a diferença entre as faces. O endoderma apresenta marcações em sua extremidade apical da proliferação celular e da citoqueratina, essa última também localizou a membrana de Reichert. Ultraestruturalmente, o endoderma parietal é composto por células poliédricas com projeções nítidas e microvilosidades, com o núcleo ocupando a maior parte da célula, levando ao pouco desenvolvimento do retículo endoplasmático. As junções intercelulares são complexas com a presença de desmosomos e a membrana de Reichert é delgada com fibras colágenas presentes;</p> <p>. O saco vitelino visceral viloso apresenta vilosidades em</p>	Próprios resultados

	<p>direção à face materna, que são ricamente vascularizadas. Essas vilosidades são sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo e externamente a presença de células epiteliais colunares, com inúmeros vacúolos próximos à porção basal. Na histoquímica com P.A.S., observa-se intensa quantidade de glicoproteínas no tecido conjuntivo e nas superfícies apical e externa do endoderma. Imunohistoquimicamente, a citoqueratina reage com a extremidade do endoderma, a proliferação celular localiza todas as camadas, em especial a extremidade do endoderma, e a vimentina os vasos fetais. Ultraestruturalmente, as células endodérmicas apresentam intenso contato lateral e, no seu interior, a presença de vacúolos refringentes na porção basal e na apical vesículas e vacúolos relacionados a microvilosidades;</p> <p>. Há presença da variação do epitélio do saco vitelino visceral de acordo com a região. Nas localizações, longe da placenta, o epitélio é pavimentoso e, próximo da placenta, é colunar. Na histoquímica também se encontra o transporte de glicoproteínas na membrana basal e superfícies apical e externa do endoderma. A localização da proliferação celular ocorre com predominância no tecido conjuntivo e mesotélio. Ultraestruturalmente, o citoplasma do endoderma está preenchido por vesículas, vacúolos e gotículas refringentes na porção basal e condensadas na apical. O complexo de Golgi está orientado na posição supranuclear e os retículos endoplasmáticos, granular (predomínio na porção basal) e agranular, são encontrados ao longo do citoplasma. Na associação de microvilosidades com a exocitose das vesículas. Subjacente ao endoderma, encontram-se vasos fetais que se localizam próximos à membrana basal;</p>	
30° dia	<p>. Macroscopicamente, o saco vitelino apresenta moderados vasos que iniciam a sua ramificação para as margens;</p> <p>. O endoderma parietal continua proliferando, aumentando cada vez as diferenças nas projeções entre as faces da placenta. Nas imunomarcações, a citoqueratina e o PCNA reagem ao endoderma;</p> <p>. O saco vitelino visceral viloso está bem desenvolvido, o epitélio de revestimento é prismático com grandes vacúolos refringentes na porção basal e inúmeras projeções citoplasmáticas. Imunohistoquimicamente, a vimentina marca as células endoteliais do tecido conjuntivo e a proliferação celular esteve em todas as camadas, concentrando-se no endoderma;</p> <p>. O saco vitelino visceral, longe da placenta, apresenta um epitélio colunar alto, com projeções citoplasmáticas próximas ao saco vitelino visceral viloso. A imunolocalização da proliferação marca todas as camadas;</p>	Próprios resultados
30° ao 35° dia	<p>. A placenta alcança a forma madura. E a maior parte da superfície fetal da placenta está revestida pelo endoderma do saco vitelino parietal;</p>	Carter et al. (1998)
32° dia	<p>. Inicia-se a involução do epitélio prismático alto do saco vitelino visceral do polo da cavidade amniótica, oposta à placenta;</p> <p>. Depois do desaparecimento da maior parte dos vilos e da involução da maior parte dos capilares fetais, os quais tinham</p>	Kaufmann; Davidoff (1977)

	<p>um contato com o saco vitelino, o epitélio afina a uma única camada de revestimento;</p> <p>. Esse processo continua até o término da gestação: no nascimento somente o saco vitelino que recobre a placenta, margeando, e somente uma faixa de aproximadamente 1 cm do saco vitelino livre, consiste do saco vitelino viloso com epitélio prismático alto e com pregas (DEMPSEY, 1953; PETRY; KÜHNEL, 1963);</p>	
35° ao 40° dia	<p>. A placenta madura é constituída por uma simples camada de epitélio colunar, embora a rápida proliferação das pregas ou engrossamento da camada celular;</p> <p>. O endoderma do saco vitelino parietal mostra imunoreação à citoqueratina, embora sua distribuição tenha sido desigual, com uma maior expressão da proteína na extremidade basolateral das células, e a não-reação à vimentina. Porém, o endoderma está sobre uma única camada de células mesênquimais que eram residentes na membrana de Reichert (células que demonstraram intensa reação à vimentina e não-marcação da citoqueratina) com núcleos das células orientados paralelamente à placenta;</p> <p>. O saco vitelino visceral da placenta compreende regiões lisas e vilosas. O endoderma do saco vitelino é voltado para o lúmen uterino, constituído de uma camada única de células mesênquimais que são marcadas pela vimentina;</p> <p>. A camada mais interna das células, que se relaciona com o âmnio, é supostamente de origem mesênquimal (DUVAL, 1892); que é imunomarcadas tanto pela citoqueratina como pela vimentina. Entre as camadas de células interna e externa forma-se um grupo de células hematopoiéticas que não expressam nenhuma marcação. A parede dos vasos vitelínicos é fortemente localizada pela vimentina;</p>	Carter et al. (1998)
40° dia	<p>. Macroscopicamente, o saco vitelino possui grandes vasos fetais centralizados dos quais partem inúmeras ramificações menos calibrosas em direção às margens; podendo distinguir, a olho nu, todos os componentes do saco vitelino;</p> <p>. Histologicamente, as estruturas atingem o máximo desenvolvimento como: a membrana de Reichert encontra-se espessada, com material amorfo, a espessura entre os endodermas parietal atinge altos níveis de acordo com a face da placenta e as vilosidades são amplas e longas;</p> <p>. O endoderma parietal é marcado pelo PCNA; e na histoquímica do P.A.S. as glicoproteínas estão localizadas na membrana de Reichert, superfícies apical e extremidade do endoderma. Ultraestruturalmente, o retículo endoplasmático se distribui ao longo do citoplasma, sendo o granular na região perinuclear e o agranular na porção basal. As células endodérmicas encontram-se mais fragmentadas com inúmeras microvilosidades. As junções intercelulares são elaboradas, com o desenvolvimento de material fibrilar, associando-as. E a membrana de Reichert apresenta numerosas fibras colágeno;</p> <p>. O endoderma viloso é caracterizado como prismático alto, com projeções citoplasmáticas. A reação da proliferação celular ocorreu nas camadas, predominando no endoderma. Ultraestruturalmente, é possível identificar estratificação no endoderma. O citoplasma apresenta grandes vacúolos e</p>	Próprios resultados

	<p>vesículas refringentes na porção basal e vacúolos condensados na apical em íntima relação com as microvilosidades. As junções intercelulares não estão intensas como no parietal e a membrana basal está condensada de material fibrinóide;</p> <p>. O saco vitelino visceral, distante da placenta, possui um epitélio colunar e, dependendo da região, pode haver estratificação. Na histoquímica do P.A.S., observa-se o trânsito de glicoproteínas na membrana basal e superfícies apical e extremidade do endoderma; porém as reações foram mais intensas nas regiões longe da placenta. Ultraestruturalmente, o núcleo ocupa a maior parte do citoplasma e com pouca condensação da cromatina. O citoplasma está preenchido por poucos vacúolos, predominando o extremamente grande na porção basal e os condensados na apical; ainda nessa porção as microvilosidades encontram-se reduzidas. As junções intercelulares não são intensas com as bordas, tendendo a uma reta e com pouca presença de desmosomos, e a membrana basal está condensada com material fibrinóide no seu interior. No tecido conjuntivo, encontra-se grande quantidade de vasos fetais, relacionados com a membrana basal;</p>	
55º dia	<p>. Macroscopicamente a vascularização é mais evidente, com vasos fetais centralizados que emitem ramificações, abrangendo todo o território vitelínico;</p> <p>. O endoderma parietal reduz drasticamente em ambas as faces, levando a uma redução da membrana de Reichert. Na face materna, o epitélio não apresenta projeções e passa a ser classificado como epitélio simples colunar e, na fetal, as projeções reduzem de tamanho, ficando semelhante a um epitélio pseudoestratificado, sendo que, em ambas as faces, os núcleos estão condensados. Na imunomarcagem não apresenta reação à proliferação celular;</p> <p>. O endoderma visceral reduz a sua espessura, classificando-o como pavimentoso com a presença de núcleos condensados. Adjacente a ele, encontra-se uma delgada camada de tecido conjuntivo. Na imunohistoquímica, a vimentina reage com os vasos fetais e a proliferação celular é observada apenas na margem do anel fibrovascular;</p>	Próprios resultados
65º dia	. Várias alterações de degeneração foram aparentes (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961). O endoderma do saco vitelino parietal se torna descontínuo (BJELLIN; SJÖQUIST; CARTER, 1975). A citoqueratina reage ao endoderma com menos, reações localizadas na placenta madura e a redução da imunomarcagem de algumas células são reduzidas;	Carter et al. (1998)
Término	<p>. A descrição da placenta do guinea pig seria incompleta sem a inclusão do saco vitelino;</p> <p>. Muitos autores enfatizam a grande importância funcional do assim chamado saco vitelino da placenta para os processos metabólicos entre a mãe e o feto (ASAI, 1914; ANDERSON; LEISSRING, 1961; LEISSRING; ANDERSON, 1961; LARSEN, 1963a, b; PADYKULA; DEREN; WILSON, 1966; KRZYZOWSKA-GRUCA; SCHIEBLER, 1967; CARPENTER; FERM, 1969; KING; ENDERS, 1970 a,b);</p> <p>. Entretanto, alguns estudos mostraram que o saco vitelino também tem influência essencial nos processos metabólicos e</p>	Kaufmann; Davidoff (1977)

	transporte no desenvolvimento da gestação durante o período final (KING; ENDERS, 1970 b; KING, 1972);	
	. Várias alterações degenerativas são aparentes (DAVIES; DEMPSEY; AMOROSO, 1961). O endoderma do saco vitelino parietal é descontínuo (BJELLIN; SJÖQUIST; CARTER, 1975); com pouca marcação a citoqueratina;	Carter et al. (1998)
Tempo de gestação	. Podem variar de 59 a 72 dias;	Rood; Weir (1970)
	. Variam de 63 a 66 dias nas grandes fêmeas.	Kaufmann; Davidoff (1977)

Assim, o guinea pig é um importante modelo animal para o entendimento da placentação humana (KAUFMANN, 2004; CARTER et al., 2006; CARTER, 2007), apresentando grandes semelhanças com os humanos (BLOOM; BARTELMEZ, 1940; ENDERS, 1965; GONZALES-CRUSSI; ROTH, 1976; GARCIA; FERNANDEZ, 2001; CARTER, 2007). Dessa forma, o saco vitelino vem sendo abordado como uma importante estrutura na manutenção da fase inicial da gestação dos humanos (FUKUDA, 1973; NOGALES, et al., 1993) e dos vertebrados em geral (MOSSMAN, 1937, 1987; STEVEN, 1975; BLACKBURN, 1993; MCGEADY et al., 2006; WOODING; BURTON, 2008). E diferente do esperado, propomos que ele participa na manutenção da gestação inicial, juntamente com a placenta corioalantoica e as glândulas uterinas, mas, é de fundamental importância na gestação média, características que não devem ser específicas somente do guinea pig, mas de todos os caviomorfos. Assim, são necessárias investigações detalhadas, não apenas do saco vitelino, bem como do útero e das outras membranas, em várias espécies, para o melhor entendimento desse fenômeno da nutrição embrionária.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia proposta e o material analisado, propomos as seguintes conclusões:

- o saco vitelino parietal e a cavidade do saco vitelino estão temporariamente presentes em um curto período da implantação embrionária. E o desaparecimento dessas estruturas não afeta o desenvolvimento do saco vitelino visceral;

- é necessária uma mudança na nomenclatura em relação ao saco vitelino parietal, pois, na implantação embrionária, esse termo refere-se ao saco vitelino, longe da placenta, e não ao saco vitelino que recobre a placenta durante as outras fases da gestação. Assim, sugere-se a denominação de saco vitelino da placenta ou placentário;

- a importância do saco vitelino na manutenção da gestação na fase inicial é questionada, por se tratar de um período no qual ele está se formando e desenvolvendo. Assim, propomos que a placenta corioalantoica e o saco vitelino placentário são de extrema importância nesse período dos caviomorfos, pois suas formações antecedem ao saco vitelino visceral;

- há uma mudança no revestimento do saco vitelino sobre a placenta corioalantoica entre o 12º e o 16º dia, passando de um epitélio pseudoestratificado para projeções, que se assemelham a uma árvore;

- a membrana de Reichert não foi observada no 12º dia, mas, sim, um espaço preenchido de material extracelular e vacúolos. Essa membrana foi encontrada a partir do 16º dia e, com o desenvolvimento gestacional, torna-se cada vez mais espessa, sendo constituída de material amorfo e acelular;

- o auge da transferência de nutrientes ao feto, baseado na estrutura, ultraestrutura, histoquímica e imunohistoquímicas, encontra-se entre o 22º e 40º dia, em especial no 40º dia;

- a involução do saco vitelino é observada no último terço da gestação, através de várias alterações degenerativas, como a descontinuidade e a redução do endoderma dos sacos vitelinos, placentário e visceral;

- portanto, sugerimos que o saco vitelino é de fundamental importância na gestação média e participa na manutenção da gestação inicial, juntamente com a placenta corioalantoica e as glândulas uterinas. Características que não devem ser específicas somente

do guinea pig, mas de todos os caviomorfos. Investigações detalhadas, não só do saco vitelino, bem como, do útero e das outras membranas extraembrionárias, em várias espécies, são necessárias para o melhor entendimento desse fenômeno da nutrição embrionária.

Referências

REFERÊNCIAS

- AMOROSO, E. C. Placentation. In: _____. **Marshall's physiology of reproduction**. London: Longmans, Green&Co, 1952.
- ANDERSON, J. W.; LEISSRING, J. C. The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea pig. II. Histochemistry of tissues involved in prenatal transfer. **American Journal of Anatomy**, v. 109, p. 157-174, 1961.
- ASAI, T. Zur Entwicklung und Histophysiologie des Dottersacks der Nager mit Enttypy des Keimfelds. **Anatomische Hefte**, v. 51, p. 467-641, 1914.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 760-772, 2010.
- BARONE, R. **Anatomie comparée des mammifères domestiques. Splanchnologie**. Paris: Bigot Frères, 1976. p. 579-605. v. 2.
- BIELINSKA, M.; NARITA, N.; HEIKINHEIMO, M.; PORTER, S. B.; WILSON, D. B. Erythropoiesis and vasculogenesis in embryonic bodies lacking visceral yolk sac endoderm. **Blood**, v. 88, p. 3720-3730, 1996.
- BISCHOFF, T. L. W. **Entwicklung des Meerschweinchens Diss.** Univ. Giessen, 1852.
- BJELLIN, L.; SJÖQUIST, P. O. B.; CARTER, A. M. Uterine, maternal placental and ovarian blood flow throughout pregnancy in the guinea pig. **Zeitschrift fur Geburtshilfe und Perinatologie**, v. 179, p. 179-187, 1975.
- BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMAN, H.; BROWN, E. M. (Ed.). **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 279-294.
- BJÖRKMAN, N.; DANTER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals. A Review. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 129-158, 1989.
- BLOOM, W.; BARTELMEZ, G. W. Hematopoiesis in young human embryos. **American Journal of Anatomy**, v. 67, p. 21-53, 1940.
- BONATELLI, M.; CARTER, A. M.; FERNANDES MACHADO, M. R.; OLIVEIRA, M. F.; LIMA, M. C.; MIGLINO, M. A. Placentation in the paca (*Agouti paca*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 9, 2005.
- BUTT, J. H.; WILSON, T. H. Development of sugar and amino acid transport by intestine and yolk sac of the guinea pig. **American Journal of Physiology**, v. 215, p. 1468-1477, 1968.

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

CARPENTER, S. J.; FERM, V. H. Uptake and storage of trofoblast by the rodent yolk sac placenta: An electron microscopic study. **American Journal of Anatomy**, v. 125, p. 429-456, 1969,

CARTER, A. M. Animal models of human placentation. **Placenta**, v. 28, p. 41-47, 2007. Suplemento.

CARTER, A. M. Current topic: restriction of placental and fetal growth in the guinea-pig. **Placenta**, v.14, p. 125-135, 1993.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; JONES, C. J. P.; MESS, A.; PFARRER, C.; PIJNENBORG, R.; SOMA, H. Comparative placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion – a workshop report. **Placenta**, v.27, p. 30-33, 2006.

CARTER, A. M.; TANSWEEL, B.; THOMPSON, K.; HAN, V. K. M. Immunohistochemical identificantion of epithelial and mesenchymal cell types in the chorioallantoic and yolk sac placenta of the guinea-pig. **Placenta**, v. 19, p. 489-500, 1998.

CLINE, M. J.; MOORE, M. A. S. Embryonic origin of the mouse macrophage. **Blood**, v. 39, p. 842-849, 1972.

CONCEIÇÃO, R. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F. MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 253-259, 2008.

DAVIDOFF, M.; SCHIEBLER, T. H. Über den feinbau der meerschweinchenplacenta während der Entwicklung. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 130, p. 234-254, 1970.

DAVIES, J.; DEMPSEY, E. W.; AMOROSO, E. C. The subplacenta of the guinea pig: development, histology and histochemistry. **Journal of Anatomy**, v. 95, p. 457-473, 1961.

DEMPSEY, E. W. Electron microscopy of the visceral yolk sac epithelium of the guinea pig. **American Journal of Anatomy**, v. 93, p. 331-364, 1953.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. II. Vitamin B₁₂ uptake by rabbit yolk sacs. **Development Biology**, v. 13, p. 349-369, 1966a.

DEREN, J. J. PADYKYLA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac III. The development of amnio acid transport by yolk sac. **Development Biology**, v. 13, p. 370-384, 1966b.

DISSE, J. Die Eikammer bei Nagern, Insektivoren und Primaten. **Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v.15, p. 530-580, 1905.

DOCHERTY, S. M.; ILES, R. K.; WATHEN, N.; CHARD, T. The tempory anatomical structures prominent in the first trimester may be fulfilling exchange functions assigned to the placenta in the second and third trimester. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1157-1161, 1996.

DUVAL, M. Le placenta des rongeurs. II. De l'inversion des feuillets chez les rongeurs. **Journal of Anatomy and Physiology Paris**, v. 26, p. 521-592, 1890.

DUVAL, M. Le placenta des rongeurs. IV. Le placenta du cochon d'Inde. **Journal of Anatomy and Physiology Paris**, v. 28, p. 58-408, 1892.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **American Journal of Anatomy**, v. 116, p. 29-67, 1965.

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

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

ENDERS, A. C.; WINSATT, W. A.; KING, B. Cytological development of yolk sac endoderm and protein-absorptive mesothelium in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. **American Journal of Anatomy**, v. 146, n. 1, p. 1-30, 1976.

FERNER, K.; MESS, A. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 178, p. 39-50, 2011.

FLAMINI, M. A.; PORTIANSKY, E. L.; FAVARON, P. O.; MARTINS, D. S.; AMBROSIO, 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, n. 12, p. 963-968, 2011.

FUKUDA, T. Fetal hemopoiesis. Electron microscopic studies on human yolk sac hemopoiesis. **Virchows Archiv B Cell Pathology**, v. 146, n. 1, p. 1-30, 1973.

GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. p. 13-276

GITLIN, D.; PERRICELLI, A. Synthesis of alpha fetoproteins by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. **Cancer Research**, v. 32, p. 979-982, 1972.

GONZALES-CRUSSI, F.; ROTH, L. M. The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. **Human Pathology**, v. 7, p. 675-691, 1976.

GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 857-862, 1998.

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

HENSEN, V. Beobachtungen über die Befruchtung mit Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v 1, p. 212, 1876.

HENSEN, V. Ein frühes Stadium des im Uterus des Meerschweinchens festgewachsenen Eies. **Archiv fuer Anatomie und Physiologie, Anatomische Abteilung**, p. 60-70, 1883.

HERRMANN, E.; STOLPER, L. Ein Beitrag zur Entwicklung des Meerschweinchens. **Verhandlungen der deutschen Gynekologie Geschichte**, 1904.

HERRMANN, E.; STOLPER, L. Zur Syncytiogenese beim Meerschweinchen. **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse**, v.3, p. 114, 1905.

HESSELD AHL, H.; LARSEN, J. F. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. **American Journal of Anatomy**, v. 126, p. 315-336, 1969.

HILL, P. M.; YOUNG, M. Net placental transfer of free amino acids against varying concentrations. **The Journal of Physiology**, v. 235, p. 405-422, 1973.

HILLEMANN, H. H.; GAYNOR, A. I. The definitive architecture of the placentae of nutria, *Myocastor coypus* (Molina). **American Journal of Anatomy**, v. 109, p. 299-317, 1961.

HOGAN, B. L. M.; COOPER, A. R.; KURKINEN, M. Incorporation into Reichert's membrane of laminin-like extracellular proteins synthesized by parietal endoderm cells of the mouse embryo. **Development Biology**, v. 80, p. 289-300., 1980.

HOYES, A. D. The human fetal yolk sac: Na ultrastructural study of four specimens. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 99, p. 469-490, 1969.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY EMBRYOLOGICAL NOMENCLATURE. **Nomina embryologica veterinaria**. 2. ed. Ghent, 2006.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinária**. 5. ed. Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2005.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY HISTOLOGICAL NOMENCLATURA. **Nomina histological**. 2. ed. [s.l]: Revista Zurich, 1994.

JAHN, L.; KREUZER, J.; Von HODENBERG, E.; KÜBLER, W.; FANKE, W. W.; ALLENBERG, J.; IZUMO, S. Cytokeratins 8 and 18 in smooth muscle cells. **Arteriosclerosis Thromb**, v. 13, p. 1631-1639, 1993.

JANSSON, T.; PERSSON, E. Placental tranfer of glucoes anda mino acids in intrauterine growth retardation: studies with substrate analogs in the awake guinea pig. **Pediatric Research**, v. 28, p. 203-208, 1990.

JONES, C. P. J.; JAUNIAUX, E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. **Micron**, v. 2, p. 145-173, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 448.

JUNQUEIRA, L. C. U.; ZAGO, D. **Embriologia médica e comparada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 291.

KANASHIRO, C.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. M.; CARTER, A. M. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 57, p. 1-13, 2009.

KAUFMANN, P. Die meerschweinchenplacenta und ihre entwicklung. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 129, p. 82-101, 1969.

KAUFMANN, P. Electron microscopy of the guinea-pig placental membranes. **Placenta**, v. 2, p. 3-10, 1981.

KAUFMANN, P. Guinea pig *Cavia porcellus*. In: Benirschke, K. **Comparative placentation**. Disponível em: <<http://medicine.ucsd.edu/cpa>. 2004>. Acesso em: 10 de setembro de 2012.

KAUFMANN, P.; DAVIDOFF, M. The guinea pig placenta. **Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology**, v. 53, p. 1-91, 1977.

KATAYAMA, I.; KAYANO, H. Images in clinical medicine. Yolk sac with blood island. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 617, 1999.

KIND, K. L.; ROBERTS, C. T.; SOHLSTROM, A. I.; KATSMAN, A.; CLIFTON, P. M. ROBINSON, J. S. Chorionic maternal feed restriction impairs growth but increase adiposity of the fetal guinea pig. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative**, v. 288, p. 119-126, 2005.

KING, B. F. Comparative anatomy of the placental barrier. **Bibliotheca Anatomica (Karger, Basel)**, n. 22, p. 13-28, 1982.

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

KING, B. F. The permeability of the guinea pig parietal yolk sac placenta to peroxidase and ferritin. **American Journal of Anatomy**, v. 134, p. 365-376, 1972.

KING, B. F.; ENDERS, A. C. Comparative development of the mammalian yolk sac. In: NOGALES, F. F. (Ed.). **The human yolk sac and yolk sac tumors**. Berlin: Springer, p. 1-23, 1993.

KING, B. F.; ENDERS, A. C. Transport of horseradish peroxidase by the guinea pig visceral yolk sac. **Anatomical Record**, v. 166, p. 331, 1970a.

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

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

KING, B. F.; TIBBITS, F. D. The fine structure of the chinchilla placenta. **American Journal of Anatomy**, v. 145, p. 33-56, 1976

KRYZOWSKA-GRUCA, T. H. Schiebler: Experimentelle untersuchungen am dottersackepithel der ratte. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 79, p. 157-171, 1967.

LARSEN, J. F. Electron microscopy of the chorioallantoic placenta of the rabbit. I. The placental labyrinth and the multinucleate giant cells of the intermediate zone. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 7, p. 535-549, 1963a.

LARSEN, J. F. Histology and fine structure of the avascular and vascular yolk sac placentae and the obplacental giant cells in the rabbit. **American Journal of Anatomy**, v. 112, p. 269-284, 1963b.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy. A clinical oriented approach.** Oronto: Decker, 1987. p. 296.

LEISSRING, J. C.; ANDERSON, J. W. The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea pig. I. Prenatal rates and routes. **American Journal of Anatomy**, v. 109, p. 149-155, 1961.

LIU, K. H.; BREWTON, R. G.; BAUMBACH, G. A.; GODKIN, J. D. Characterization of protein production by ovine placental membranes: identification of a placental retinalbiding protein. **Endocrinology**, v. 129, p. 126-132, 1991.

LLOYD, J. B.; WILLIAMS, K. E.; MOORE, A. T.; BECK, F. Seletive uptake and intracellular digestion of protein by rat yolk sac. In: HEMMINGS, W. A. (Ed.). **Maternofoetal transmission of immunoglobulins.** Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p. 169-178. (Clinical and experimental immune reproduction, n. 2).

LUCKETT, W. P. Superordinal and intraordinal affinities of rodents: developmental evidence from the dentition and placentation. In: LUCKETT, W. P.; HARTENBERGER, J. L. (Ed.). **Evolutionary Relationships Among Rodents.** New York: Plenum Press, Nato ASI-Series, 1985. p. 227-276.

LUCKETT, W. P.; MOSSMAN, H. W. Development and phylogenetic significance of the fetal membranes and placenta of the African hystricognathous rodents, *Bathyergus* and *Hystrix*. **American Journal of Anatomy**, v. 162, p. 266-285, 1981.

MCGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T. **Veterinary Embryology**. London: Blackweel Publishing Ltda., 2006. p. 79-90.

MEEHAN, R. R.; BARLOW, D. P.; HILL, R. E.; HOGAN, B. L. ; HASTIE, N. D. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. **The Embo Journal**, v. 3, p. 1881-1885, 1984.

MESS, A. Development of the chorioallantoic placenta in *Octodon degus* – a model for growth processes in caviomorph rodents? **Journal of Experimental Zoology**, p. 371-383, 2007a.

MESS, A. The guinea pig placenta – model of placental growth dynamics. **Placenta**, p. 812-215, 2007b.

MESS, A. The subplacenta in *Octodon degus* and *Petromus typicus* – two hystricognath rodents without significant placental lobulation. **Journal of Experimental Zoology**, p. 172-188, 2007c.

MESS, A.; CARTER, A. Evolutionary transformations of fetal membrane charcters in Eutheria wih special reference to Afrotheria. **Journal of Experimental Zoology**, v. 306, p. 1-24, 2006.

MESS, A.; BLACKBURN, D. G.; ZELLER, U. Evolutionary transformations of fetal membranes and reproductive strategies. **Journal of Experimental Zoology**, v. 299a, p. 3-12, 2003.

MESS, A. M.; FAVARON, P. O.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Review: placentation in caviomorph rodents and their significance as animal models. In: CABRAL, R.H. (Ed.). **XXII International Symposium on Morphological Sciences**. Bologna: Medimond International Proceedings, p. 121-124, 2012.

MESS, A.; ZAKI, N.; KADYROV, V.; KORR, H.; KAUFMANN, P. Caviomorph placentation as a model for trophoblast invasion. **Placenta**, v. 28, p. 1234-1238, 2007.

MIGLIACCIO, G.; MIGLIACCIO, A. R.; PETTI, S.; MAVILIO, F.; RUSSO, G.; LAZZARO, D.; TESTA, U.; MARINUCCI, M.; PESCHLE, C. Human embryonic hemopoiesis: Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, p. 51-60, 1986.

MIGLINO, M. A. O enigma vitelínico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 86, 2009. Suplemento.

MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. R.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MIGLINO, M. A.; CARTER, A. M.; AMBRÓSIO, C. E.; BONATELLI, M.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS FERRAZ, R. H.; RODRIGUES, R. F.; SANTOS, T. C. Vascular organisation of the hystricomorph placenta: a comparative study in the agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. **Placenta**, v. 25, p. 438-448, 2002.

MIGLINO, M. A.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; BONATELLI, M.; MACHADO, M. R. F.; MESS, A. Development of the inverted visceral yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Placenta**, v. 29, p.748-752, 2008.

MINUTH, W. W.; TIEDEMANN, K. The pig yolk sac II: Analysis of synthesized proteins. **Histochemistry**, v. 68, p. 147-158, 1980.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 609.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie Institute Contributions to embryology**, v. 26, p. 129-246, 1937.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animals domésticos mecanismos de desarrollo y malformaciones**. Zaragoza: Acribia, 1990. p. 399.

NOGALES, F. F.; BELTRAN, E.; GONZÁLEX, F. Morphological changes of the secondary human yolk sac early pregnancy wastage. In:_____. **Human yolk sac and yolk sac tumor**. Springer-Verlag, Heildelberg, 1993. p. 174-194.

PADYKULA, H. A.; DEREN, J. J.; WILSON, T. H. Development of structure and functions in the mammalian yolk sac. I. Developmental morphology and vitamn B₁₂ uptake of the rat yolk sac. **Developmental Biology**, v. 13, p. 311-348, 1966.

PALIS, J.; Mc GRATH, K. E.; KINGLEY, P. D. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine Yolk sac explants. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 156-163, 1995.

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

PATTEN, B. M. **Embriologia humana**. 5. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1969.

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

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

PEREDA, J.; MONGE, J. I.; NIIMI, G. Two different pathways for the transport of primitive and definitive blood cells form the yolk sac to the embryo in humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 8, p. 803-809, 2010.

PERROTTA, C. A. Fetal membranes of the canadian porcupine, *Erethizon dorsatum*. **American Journal of Anatomy**, v. 104, p. 35-59, 1959.

PETRY, G.; KÜHNEL, W. Histotopographische und cytlogische studien an den embryonalhüllen des meerschweinchens. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 59, p. 625-662, 1963.

PYTLER, R.; STRASSER, H. Die Vorgänge im meerschweinchenuterus von der inokulation bis zur bildung des plazentardiskus. **Zeitschrift der Gesellschaft fuer Anatomie**, v. 76, p. 386-420, 1925.

ODUOR-OKELO, D. An electron microscopic study of the chorioallantoic placenta and the subplacenta of the cane rat (*Thryonomys swinderianus* Temminck). **Placenta**, v. 25, p. 438-442, 1984.

ODUOR-OKELO, D.; GOMBE, S. G. Placentation in the cane rat (*Thryonomys swinderianus*). **African Journal of Ecology**, v. 20, p. 49-66, 1982.

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

OLIVEIRA, M. F.; FAVARON, P. O.; AMBROSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. M. Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Thrichomys laurentinus* (echimyidae) and the evolution of hystricognath rodents. **Journal of Experimental Zoology**, v. 318, p. 13-25, 2012a.

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, p. 878-881, 2012b.

REICHERT, C. B. **Entwicklungsgeschichte des Meerschweinchens**. Berlin: Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften, 1862.

RENFREE, M. B.; HENSLEIGH, H. C.; MCLAREN, A. Development changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v. 33, n. 2, p. 435-446, 1975.

RIVEROS, A. C. G. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

RIVEROS, A. C. G.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Centro Científico Conhecer**, v. 6, n. 11, p. 1-13, 2010.

RODRIGUES, R. F.; CARTER, A. M.; AMBROSIO, C. E.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 31, 2006.

ROOD, J. P.; WEIR, J. Reproduction in female wild guinea pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 393-409, 1970.

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 21, p. 324-347, 1992.

SADLER, T. W. **Embriologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 347.

SALAMAT, M.; GÖTZ, W.; HORSTER, A.; JANOTTE, B.; HERKEN, R. Ultrastructural localization of carbohydrates in Reichert's membrane of the mouse. **Cell and Tissue Research**, v. 272, p. 375-381, 1993.

SELENKA, E. **Studien zur Entwicklungsgeschichte der Tiere**. Die Keimblattumkehr im Ei der Nagetiere. Wiesbaden, 1884.

SELWOOD, L.; JOHNSON, M. H. Trophoblast and hypoblast in the monotreme, marsupial and eutherian mammal: evolution and origins. **BioEssays**, v. 28, p. 128-145, 2006.

SHI, W. K.; HOPKINS, B.; THOMPSON, S.; HEATH, J. K.; LUKE, B. M.; GRAHAM, C. F. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sac and other foetal organs. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 85, p. 191-206, 1985.

SOPRANO, D. R.; SOPRANO, K. J.; GOODMAN, D. S. Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. **The Proceedings of the National Academy of Science**, v. 83, p. 7330-7334, 1986.

SPEE, G. F. V. Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der fruehen Stadien des Meerschweinchens bis zur Vollendung der Keimblase. **Archiv fuer Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, p. 44-60, 1883.

STARCK, D. **Embryologie**. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1975.

STEVEN, D. H. **Comparative placentation**. New York: Academic Press, 1975.

TAPIOL, J. P. Significado morfofuncional del saco vitelino durante el period embrionario humano: revisión Del problema e impacto em clínica. **Contribuciones Científicas y Tecnológicas, Area Ciências Médicas**, n. 128, 2001.

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

TIBBITS, F. D.; HILLEMANN, H. H. The development and histology of the chinchilla placentae. **Journal of Morphology**, v. 105, p. 317-366, 1959.

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

TIEDEMANN, K.; MINUTH, W. W. The pig yolk sac I: Fine structure of the poshaematopoietic organ. **Histochemistry**, v. 68, p. 133-146, 1980.

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

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for development toxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 521-526, 2007.

VERKESTE, C. M.; SLANGEN, B. F. M.; DAEMEM, M.; VAN STRAATEN, H.; KOHNEN, G.; KAUFMANN, P. The extent of trophoblast invasion in the preplacental vasculature of the guinea pig. **Placenta**, v. 19, p. 49-54, 1998.

VIEBAHN, C. Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. **Acta Anatomica**, v. 154, p. 79-97, 1995.

WADDELL, P. J.; KISHINO, H.; OTA, R. A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics. **Genome Inform Ser workshop Genome**, v. 12, p. 141-154, 2001.

WESTHEIDE, W.; RIEGER, R. **Spezielle Zoologie – Teil 2: Wirbel-oder Schädeltiere 2**. Aufl. Spektrum Verlag: Heidelberg, 2010

WILD, A. E. Role of the cell surface in selection during transport of proteins from mother to fetus and newly born. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 271, p. 395-410, 1975.

WISLOCKI, G. B.; PADYKULA, H. A. Reichert's membrane and the yolk sac of the rat investigated by histochemical means. **American Journal of Anatomy**, v. 92, p. 117-151, 1953.

WISLOCKI, G. B.; DEANE, H. W.; DEMPSEY, E. W. The histochemistry of the rodent's placenta. **American Journal of Anatomy**, v. 78, p. 281-345, 1946.

WITCHI, E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. **Contribution to Embryology, Carnegie Institute**, v. 32, p. 67-80, 1948.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FRÖHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KÖLLE, S.; PRELLE, K. REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M. WENIGERKIND, H.; SNOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine-strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: WOODING, F. B. P.; FLINT, G. E. (Ed.) **Marshall's Physiology of reproduction**. 4. ed. Chapman and Hall: London, 1994. p. 230-466. III part.

WOODING, P.; BURTON, G. **Comparative placentation: structures, functions and evolution**. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2008. p. 1-13.

WOURMS, J. P. Auxiliary embryonic tissue of fishes. **Journal Morphology**, v. 248, p. 303. 2001.

WOURMS, J. P.; GROVE, B. D.; LOMBARDI, J. The maternal embryonic relationship in viviparous fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish Physiology**, New York: Academic Press, 1988. v. 10, p. 1-119.

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

YAMASHITA, A. Role of yolk sac endodermal cells with special reference to the fetal macrophage differentiation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 139-144, 1996.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: A nova fronteira da medicina. In: _____. **Células-tronco hematopoéticas**. São Paulo:Atheneu, 2006. p. 49-65.

ZAKI, N.; KADYROV, M.; HUPPERTZ, B.; KORR, H. KAUFMANN, P.; MESS, A. Trophoblast invasion can be studied *in vivo* in the subplacenta of caviomorph rodents. **Placenta**, v. 26, p. 73, 2005.

Apêndices

APÊNDICE A

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

SILVA, F. O. C.; BRITO, T. R.; VASCONCELOS, B. G.; CANABRAVA, H. A. N.; PEREIRA, C. C. H.; NOLASCO, R. M.; HONORATO, A. G. O. Origens e distribuições dos nervos femorais em ovinos sem raça definida. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 6, p. 978-981. 2011.

VASCONCELOS, B. G.; SILVA, F. O. C.; MIRANDA, R. L.; PEREIRA, C. C. H.; SANTOS, A. C.; MIGLINO, M. A. Origem e distribuição da artéria celíaca de avestruzes (*Struthio camelus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 108-114. 2012.

RESENDE, G. G. N.; FERREIRA, F. A.; SILVA, F. O. C.; VASCONCELOS, B. G.; IGLESIAS, L. P.; SANTOS, A. C.; MIGLINO, M. A. Suprimento vascular arterial do timo de marrecos (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 1-10. 2012.

HONORATO, A. G. O.; PEREIRA, C. C. H.; ORTEGA, J. F.; ARANTES, R. C.; VASCONCELOS, B. G.; SILVA, F. O. C. Artérias das glândulas adrenais em avestruzes (*Struthio camelus*). **Biotemas**, v. 25, n. 1, p. 125-129. 2012.

SANTOS, A. C.; BERTASSOLI, B. M.; OLIVEIRA, F. D.; OLIVEIRA, D. M.; OLIVEIRA, V. C.; VASCONCELOS, B. G.; CARVALHO, A. F.; MANÇANARES, C. A. F.; ASSIS NETO, A. C. Estrutura macro e microscópica das glândulas salivares parótidas em duas espécies de procionídeos: mão-pelada (*Procyon cancrivorus*, G. Cuvier, 1798) e quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 25, n. 1, p. 93-101. 2012.

MANÇANARES, C. A. F.; SANTOS, A. C.; PIEMONTE, M. V.; VASCONCELOS, B. G.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; ASSIS NETO, A. C. Macroscopic and microscopic analysis of the tongue of the common opossum (*Didelphis marsupialis*). **Microscopy Research and Technique**, 2012.

VASCONCELOS, B. G.; IGLESIAS, L. P.; HONORATO, A. G. O.; SANTOS, A. C.; MIGLINO, M. A.; SILVA, F. O. C. Ramificação e distribuição do nervo mediano de javalis (*Sus sus scrofa*). **ARS Veterinária**, v. 28, n. 2, p. 118-121. 2012.

IGLESIAS, L. P.; SILVA, F. O. C.; VASCONCELOS, B. G.; RIBEIRO, L. A.; HODNIKI, N. F.; GOMES, L. R.; MIGLINO, M. A.; MELO, A. P. F. Distribuição do nervo fibular comum em fetos de equinos e descrição anatômica de pontos para bloqueio anestésico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 672-676. 2012.

APÊNDICE B**PUBLICAÇÕES ORIUNDAS DA TESE**

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

Short communication

Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae)

M.F. de Oliveira^a, A.M. do Vale^a, P.O. Favaron^b, B.G. Vasconcelos^b, G.B. de Oliveira^a, M.A. Miglino^b, A. Mess^{b,*}

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

^b Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 28 June 2012

Keywords:

Vitelline placenta
Caviomorphs
Evolution

ABSTRACT

Caviomorph development includes an inverted yolk sac. Since principle processes are not understood, we investigated its differentiation in *Galea* and re-examined material from the guinea pig. *Galea* showed the typical caviomorph conditions in blastocyst development and the nature of the definitive yolk sac, formed of the visceral layer that became villous, proliferative, vascularized and attached to the uterus and placenta. In contrast to what was known before, in both species parts of the parietal yolk sac and a yolk sac cavity were temporarily present. Data suggest that early yolk sac development in caviomorphs is more complex than thought before.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caviomorph rodents underwent an impressive radiation in South America [1,2], accompanied by a stable pattern of placental characters [3–5]. Among them, the yolk sac is regarded to be completely inverted and associated to the uterus and chorioallantoic placenta [3,4], possessing absorption and transfer of nutrients [6–9]. The inversion is associated with the absence of the outermost parts, the parietal yolk sac, and the inverse nature of the innermost visceral yolk sac [3]. Data are derived from only one species, the guinea pig *Cavia porcellus* [10–14], whereas early developmental stages are not known for other species [4,15–20]. We studied the development of yolk sac inversion in a small cavy native to Brazil, the preá *Galea spixii* Wagler, 1831. Pregnancy is 48 days and litters size 2 to 4 [19,21]. In addition, we re-examined historical material from the guinea pig.

2. Methods

Data were obtained from 30 *Galea* females of gestational days 6, 10–15, 20, 25, and 30. The project was registered by IBAMA Nr. 1478912, approved by the Ethical Committee of the University of Mossoró (Nr. 23091.001975/10-24). Tissues for histology were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, sectioned at 5 µm, stained with haematoxylin and eosin (HE) and Toluidine blue, investigated with an Olympus microscope (CX 31 RBSFA). Samples for SEM were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 2% phosphate-buffered osmium tetroxide, dried by

critical point, sputtered for 2 min by gold at 50 mA and investigated with a Zeiss LEO VP 435 microscope. Immunohistochemistry [22] was performed for vimentin (mouse monoclonal anti-human antibody V9, sc-6260, 1:300, Santa Cruz Biotechnology, USA) and PCNA (mouse monoclonal anti-human antibody PC 10, sc-56, 1:800, Santa Cruz); incubated with a secondary antibody by an Advance™ kit with HRP enzyme (DakoCytomation, USA, K4068) and detected by a liquid DAB + chromagen system (Dako, K3468). Negative controls were performed by using anti-mouse Aries antibody instead of the primary antibody (class G, Dako). Histological slides of *Cavia* were analysed for comparison (Embryological collection, Museum of Natural History Berlin).

3. Results

In *Galea*, implantation occurred on day 6, resulting in embryo-blast and trophoctoderm (Fig. 1A). On day 10, the first development of an ectoplacental cone as precursor of the placenta and hypoblast cell groups as precursors of yolk sac tissues were present (Fig. 1B). On day 12, the hypoblast had transformed into an outer and inner layer, the parietal and visceral yolk sac (Fig. 1C). The trophoctoderm at the outer wall of the blastocyst was accompanied by mesoderm (Fig. 1C). The trophoblast of the ectoplacental cone then started to invasively intruding uterine tissues close to the maternal blood vessels. On day 13, the visceral and parts of the parietal yolk sac layers were also found; the latter closely attached to the trophoctoderm. The two layers of the yolk sac enclosed a yolk sac cavity (Fig. 1D,E). A similar condition was found in the guinea pig on day 9 (Fig. 1F). In both species full yolk sac inversion, i.e. exposition of the visceral yolk sac endoderm to the uterus, was present on the very next day, associated with the absence of the parietal

* Corresponding author. Tel./fax: +55 1130917690.
E-mail address: drandrmss@aol.com (A. Mess).

Fig. 1. (A) *Galea*, day 6. Toluidine blue. Blastocyst with inner embryoblast (E) and outer trophoderm (T). (B) *Galea*, day 10. HE. Blastocyst with the first development of an ectoplacental cone (EPC) and hypoblast cell groups (HC) as precursors of yolk sac tissues. (C) *Galea*, day 12. HE. The yolk sac possessed an inner, visceral (VYS) and an outer, parietal (PYS) layer, the latter attached to the trophoderm. First differentiation of mesoderm (M) was present along the trophoderm. U = uterus. (D,E) *Galea*, day 13. HE. The two yolk sac layers enclosed a yolk sac cavity (YC). E = embryoblast, EC = extraembryonic cavity, A = amnion. (F) *Cavia*, day 9 (MfN Berlin, ROD-132). HE. Blastocyst with both layers of the yolk sac and yolk sac cavity.

Fig. 2. *Galea*. (A,B). Day 15. HE. Visceral yolk sac (VYS) exposed to the uterus (U) and placenta (CP). (C) Day 25. Vimentin. Villous areas of the visceral yolk sac were vascularized (arrows) with high columnar cells with microvilli. (D) Day 25. SEM. Non villous areas of the visceral yolk sac (arrow) were near the uterus. (E) Day 30. PCNA. Positive response in high columnar cells of the placental yolk sac endoderm (arrows), situated on the Reichert's membrane (RM), and the cellular trophoblast (CT) of the placenta. MBC = maternal blood channel. (F) Day 30. PCNA. Proliferation activity was high in endodermal epithelium cells (arrows) and the mesenchyme (M) of the visceral yolk sac villi.

endoderm as shown for *Galea* (Fig. 2A,B). The visceral yolk sac near the placenta became highly villous and vascularized. It had high columnar cells with microvilli (Fig. 2C). Distant from the placenta, the endoderm of the non-villous areas was closely attached to the uterus (Fig. 2D). Other parts of the visceral yolk sac covered the chorioallantoic placenta above its Reichert's membrane (Fig. 2E). It had high columnar, pseudostratified cells. All areas were proliferative (Fig. 2E,F).

4. Discussion

Our data on *Galea* indicate a rapid differentiation of yolk sac tissues in blastocysts. The early occurrence of hypoblast cells as precursor of the yolk sac and an ectoplacental cone that lead to form the placenta, is similar to the guinea pig [3,10–14]. In contrast to what was known before, in both species parts of the parietal yolk sac were temporarily present, i.e. on day 12–13 in *Galea* and day 9 in *Cavia*. The endoderm of these areas was confluent and directed towards the lumen of the enclosed cavity, indicating that they belong to the yolk sac. The parietal layer disappeared almost immediately. Then, *Galea* had a visceral yolk sac similar in position,

structure, vascularization, proliferation activity and association to uterus and placenta to the guinea pig and other caviomorphs [3–5,10–20]. Since the position of the visceral layer was unaffected by the disappearance of the outer, parietal layer, yolk sac inversion more precisely means an exposition of the visceral yolk sac to the uterus. In addition, we suggest using the term placental yolk sac [23] instead of parietal yolk sac [14] for tissues covering the placenta and resting on its Reichert's membrane, the latter most likely derived from the ectoplacental mesenchyme [22]. In conclusion, *Galea* showed the typical caviomorph conditions of blastocyst development and the nature and position of the definitive yolk sac. However, data suggest that early yolk sac inversion processes are more complex than thought before.

Acknowledgements

We are grateful for technical support to several members of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brazil and the University Sao Paulo, Brazil. We thank Dr. Peter Giere from the Embryological collection of the Museum of Natural History Berlin for providing material of the guinea pig.

References

- [1] Antoine PO, Marivaux L, Croft DA, Billet G, Ganerød M, Jaramillo C, et al. Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proc Biol Sci* 2012;279: 1319–26.
- [2] Upham NS, Patterson BD. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Mol Phylog Evol* 2012;63:417–29.
- [3] Luckett WP. Superordinal and intraordinal affinities of rodents: developmental evidence from the dentition and placentation. In: Luckett WP, Hartenberger JL, editors. *Evolutionary Relationships among rodents*. New York: Plenum Press, Nato ASI-Series; 1985. p. 227–76.
- [4] Mess A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *J Exp Zool* 2003; 299A:78–98.
- [5] Oliveira MF, Favaron PO, Ambrósio CE, Miglino MA, Mess M. Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the evolution of hystricognath rodents. *J Exp Zool* 2012;318B: 13–25.
- [6] King BF, Enders AC. The fine structure of the guinea pig yolk sac placenta. *Am J Anat* 1970;127:397–413.
- [7] King BF, Enders AC. Protein absorption and transport by the guinea pig visceral yolk sac placenta. *Am J Anat* 1970;129:261–88.
- [8] King BF. The permeability of the guinea pig parietal yolk sac placenta to peroxidase and ferritin. *Am J Anat* 1972;134:365–76.
- [9] Miglino MA, Francioli ALR, Oliveira MF, Ambrósio CE, Bonatelli M, Fernandes Machado MR, et al. Development of the inverted yolk sac in three species of caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Placenta* 2008;29:748–52.
- [10] Reichert CB. *Entwicklungsgeschichte des Meerschweinchens*. Berlin: Abh Akad Wiss; 1862.
- [11] Spee GFV. Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der fruehen Stadien des Meerschweinchens bis zur Vollendung der Keimblase. *Arch Anat Entwickl Gesch* 1883;44–60.
- [12] Selenka E. *Studien zur Entwicklungsgeschichte der Tiere. Die Keimblattumkehr im Ei der Nagetiere*. Wiesbaden; 1884.
- [13] Duval M. Le placenta des rongeurs. II. De l'inversion des feuillets chez les rongeurs. *J Anat (Paris)* 1890;26:521–92.
- [14] Kaufmann P, Davidoff M. The guinea pig placenta. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1977;53:1–91.
- [15] Perrotta CA. Fetal membranes of the Canadian porcupine, *Erethizon dorsatum*. *Am J Anat* 1959;130:35–59.
- [16] Hillemann HH, Gaynor AI. The definitive architecture of the placenta of nutria, *Myocastor coypus* (Molina). *Am J Anat* 1961;109:299–317.
- [17] Bonatelli M, Carter AM, Fernandes Machado MR, Oliveira MF, De Lima MC, Miglino MA. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3(9).
- [18] Oliveira MF, Carter AM, Bonatelli M, Ambrósio CE, Miglino MA. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). *Placenta* 2006;27:87–97.
- [19] 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).
- [20] Kanashiro C, Santos TC, Miglino MA, Mess AM, Carter AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7(57).
- [21] Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea OS. *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa – OPAS/OMS; 2008.
- [22] Carter AM, Tanswell B, Thompson K, Han VKM. Immunohistochemical identification of epithelial and mesenchymal cell types in the chorioallantoic and yolk sac placenta of the guinea-pig. *Placenta* 1998;19:489–500.
- [23] Jollie WP. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestational age. *Am J Anat* 122:513–32.

Review: Placentation in caviomorph rodents and their significance as animal models

Mess Andrea Maria¹, Oliveira Favaron Phelipe¹, Gomes Vasconcelos Bruno¹, de Oliveira Moacir Franco², Miglino Maria Angelica¹

¹Department of Surgery, University of Sao Paulo, Brazil;

²Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brazil;
E-mails: drandrmss@aol.com, phelipe.favaron@yahoo.com.br, brunog_vet@hotmail.com, moacir@ufersa.edu.br, miglino@usp.br.

1. Background

Because of major similarities, caviomorph rodents represent a pool of suitable and attractive animal models in comparison to human pregnancy [1]. Placentation in the guinea pig and its relatives have been intensely studied in the last couple of years (e.g. [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12], and [13]). Data indicate that the evolution in caviomorphs include a stable pattern of placental characters, independent from the group's variation in body size, specialized reproductive traits and ecological parameters ([10], [12], [13], and [14]). Principle processes are similar between species that are small and easy to maintain species such as the guinea pig and the largest caviomorph, the capybara, which reached human dimension with about 50 kg of body mass [12]. In the following, main aspects of placentation with special reference to trophoblast invasion, growing processes and the nature of the fetomaternal interface are summarized in regard to the significance of these rodents as animal models.

2. Placentation

Implantation in caviomorphs occurred early and invasive ([10], [14], [15], [16], and [17]). Early placental invasion is established by trophoblast cells and syncytial streamers that originate from a specialized area at the base of the placenta, the subplacenta (Fig. 1A) ([6], [12], [14], and [18]). The cytotrophoblast layers in the lateral parts of the subplacenta represent focal aggregations of proliferating cells. Invasive daughter cells that are arrested in the G1 phase, derived from these cell clusters, can be traced into the maternal tissues, using an interstitial route. Migration routes and kinetics under in vivo conditions reveal a mean invasive depth of 300–350 µm per day and a mean life span of the extravillous-like trophoblast of 30 day [4]. Before the subplacenta is fully developed, the trophoblast belonging to the ectoplacental cone

Figure 1: (A) Schematic overview about the placenta and other fetal membranes in caviomorph rodents, derived from Oliveira et al. (2008). (B) Early implantation in the guinea pig *Cavia porcellus*, derived from slices in the Embryological collection of the Museum of Natural History Berlin (Hill collection; ROD-138; day 9 of gestation).

of the blastocyst seems to have invasive potential and are found on their way into the maternal uterine tissues (Fig. 1B). This pattern of trophoblast invasion is analogous to the cell columns in humans [19]. Thus, caviomorphs are suitable models to study the kinetics of proliferation; migration and invasion of extravillous trophoblast [4]. During gestation, the placenta established lobes of labyrinth, separated by interlobular trophospongium with only maternal blood channels (Fig. 1A). The labyrinth effectively facilitates exchange between the fetal and maternal blood through a hemomonochorial placental barrier similar to the human as well as a radial arrangement of the placental disk and countercurrent blood flow (Fig. 1A) ([3], [4], [12], [14], and [16]). Placental growth is facilitated by proliferative trophoblast cells of the interlobular areas, situated on internally directed processes of fetal mesenchyme. Additional proliferation has been demonstrated for cellular trophoblast inside the labyrinth, especially in those species with highly lobulated placental architecture, but independent from variations in growth dimensions ([6], [10], and [12]).

3. Conclusion

Important characteristics of trophoblast invasion, growing processes and the fetomaternal interface in guinea pig related rodents follow an extraordinary stable pattern that is most similar to placentation in the human. Since size differences and other features are not affecting this pattern, even small species such as the guinea pig are suitable as animal model for human placentation and pregnancy.

Acknowledgements

We thank Dr. Peter Giere from the Embryological collection of the Museum of Natural History Berlin for providing material of the guinea pig. Parts of this review were developed in cooperation with Prof. Dr. Peter Kaufmann (†2010); we want to address our gratitude for his friendship and inspiration over years.

References

- [1] Carter, A.M. (2007). Animal models of human placentation. *Placenta* 28, pp.129-132.
- [2] Miglino, M.A., Carter, A.M., dos Santos Ferraz, R.H., Fernandes Machado, M.R. (2002). Placentation in the Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), Agouti (*Dasyprocta aguti*) and Paca (*Agouti paca*). *Placenta* 23, pp. 416-428.
- [3] Miglino, M.A., Carter, A.M., Ambrosio, C.E., Bonatelli, M., De Oliveira, M.F., Dos Santos Ferraz, R.H., Rodrigues, R.F., Santos, T.C. (2004). Vascular organisation of the hystricomorph placenta: a comparative study in the agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. *Placenta* 25, pp. 438-448.
- [4] Mess, A. (2007a). The guinea pig placenta: model of placental growth dynamics. *Placenta* 28, pp. 812-815.
- [5] Mess, A. (2007b). Development of the chorioallantoic placenta in *Octodon degus* – a model for growth processes in caviomorph rodents? *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution* 308, pp. 371-383.
- [6] Mess, A. (2007c). The subplacenta in *Octodon degus* and *Petromus typicus* – two hystricognath rodents without significant placental lobulation. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution* 308, pp.172-188.
- [7] Bonatelli, M., Carter, A.M., Fernandes Machado, M.R., De Oliveira, M.F., De Lima, M.C., Miglino, M.A. (2005). Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reproduction Biology and Endocrinology* 3 (9).
- [8] Oliveira, M.F., Carter, A.M., Bonatelli, M., Ambrosio, C.E., Miglino, M.A. (2006). Placentation in the rock cavy, *Kerodon ruprestris* (Wied). *Placenta* 27, pp. 87-97.
- [9] Oliveira, M.F., Mess, A., Ambrósio, C.E., Dantas, C.A.G., Favaron, P.O., Miglino, M.A. (2008). Chorioallantoic Placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reproduction Biology Endocrinology* 6 (39).
- [10] Oliveira, M.F., Favaron, P.O., Ambrósio, C.E., Miglino, M.A., Mess, M. (2012). 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* 318, pp. 13-25.
- [11] Bosco, C., Buffet, C., Bello, M.A., Rodrigo, R., Gutierrez, M., Garcoa, G. (2007). Placentation in the degu (*Octodon degus*): Analogies with extrasubplacental trophoblast and human pregnancies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology* 146, pp. 475-485.
- [12] Kanashiro, C., Santos, T.C., Miglino, M.A., Mess, A.M., Carter, A.M. (2009). Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reproduction Biology and Endocrinology* 7 (57).
- [13] Flamini, M.A., Portiansky, E., Favaron, P.O., Martins, D.S., Ambrósio, C.E., Mess, A.M., Miglino, M.A., Barbeito, C.G. (2011). Placental development and characteristics in plains viscacha (*Lagostomus maximus*) and the suitability of caviomorph rodents as animal models for human placentation. *Placenta* 32, pp. 963-968.
- [14] Mess, A. (2003). Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *Journal of Experimental Zoology (Comparative Experimental Biology)* 299, pp. 78-98.

- [15] Spee, G.F. (1883). Beitrag zur entwicklungsgeschichte der fruheren stadien des meerschweinchens bis zur vollendung der keimblase. Archive of Anatomy and Physiology 7, pp. 44-60.
- [16] Kaufmann, P., Davidoff, M. (1977). The guinea pig placenta. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology 53, pp.1-91.
- [17] Luckett, W.P. (1985). Superordinal and intraordinal affinities of rodents: Developmental evidence from the dentition and placentation. In: Luckett, W.P., Hartenberger, J.L., editors. Evolutionary Relationships among Rodents. New York: Plenum Press, Nato ASI-Series, pp. 227-276.
- [18] Kaufmann, P. (2004). Guinea Pig *Cavia porcellus*. In: Comparative Placentation. 2004. <http://placentation.ucsd.edu/cavia.htm>
- [19] Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R. (2006). Architecture of normal villous trees. In: Pathology of the Human Placenta, 5th ed., Springer, New York.