

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATHÁLIA AZEVEDO PORTILHO

O Papel da Placenta na Ontogenia do Sistema Hematopoético: Origem, Distribuição Espacial e Perfil Fenotípico e de Expressão Gênica de Células Comprometidas com a Hematopoese

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pelajo-Machado

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2017

Portilho, Nathalia Azevedo .

O papel da placenta na ontogenia do sistema hematopoético: origem, distribuição espacial e perfil fenotípico e de expressão gênica de células comprometidas com a hematopoese / Nathalia Azevedo Portilho. - Rio de janeiro, 2017.

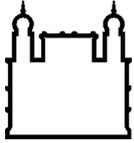
253 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Marcelo Pelajo-Machado.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hematopoese. 2. Placenta. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: NATHÁLIA AZEVEDO PORTILHO

**O Papel da Placenta na Ontogenia do Sistema Hematopoético: Origem,
Distribuição Espacial e Perfil Fenotípico e de Expressão Gênica de Células
Comprometidas com a Hematopoese**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Pelajo-Machado

Aprovada em: 10/08/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida - Presidente - Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Prof. Dr. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua - Universidade de São Paulo, USP

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos - Instituto Fernandes Figueiras, Fiocruz

Prof. Dr. Daniella Arêas Mendes da Cruz - Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Rio de Janeiro, 10 de Agosto de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos,

Aos meus pais, Arnaldo Alencar Portilho e M. Cristina Azevedo Portilho, pela torcida incessante pelo meu sucesso. Obrigada por oferecerem apoio incondicional para completar mais essa etapa. Vocês são a minha base. A confiança e o amor de vocês me impulsionam todos os dias.

À minha irmã, Renata Portilho, e cunhado, Marlon Mattos, pela amizade e torcida. Por me darem os melhores presentes, minhas afilhadas Manuela e Laura, que só me motivam.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, meu orientador e grande influência na minha vida acadêmica há sete anos. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, pela paciência, pelo incentivo e exemplo. Obrigada também pelo apoio em todas as etapas da minha formação e por estar sempre presente. Tenho enorme admiração pelo pesquisador e pessoa que você é. Serei sempre grata pela oportunidade concedida e pela confiança depositada em mim para a execução deste trabalho.

À Dra. Anne Croy pela oportunidade e orientação na Queen's University, no Canadá. Foram 12 meses de aprendizado e experiência incríveis. Seu amor pela ciência é inspirador. Obrigada por oferecer condições para que uma parte importante deste trabalho fosse realizada e por incentivar a minha carreira acadêmica. Agradeço, ainda, por ter me acolhido tão bem e deixar, junto com seu marido Carl (*in memoriam*), a ausência de casa mais leve.

Ao Dr. Chandrakant Tayade (Queen's University, Canadá) pelo acesso ao equipamento de microdissecção a laser e aos animais imunocomprometidos.

Ao Mallikarjun (Arjun) Bidarimath e Kasra Khalaj pela amizade e ajuda com as técnicas de microdissecção a laser e biologia molecular na Queen's University.

Ao Dr. Milton Ozorio Moraes e seus alunos Thyago Leal Calvo e Thiago Gomes Pinto (Laboratório de Hanseníase do IOC/FIOCRUZ) pela colaboração com a análise molecular do material microdissecado. Obrigada por cederem seu tempo para ajudar a otimizar a técnica e analisar os dados.

A todos que fazem, ou fizeram, parte do laboratório de Patologia (LABPAT) do IOC, pesquisadores, alunos, técnicos e secretária. Agradeço a convivência cordial, as risadas e a cooperação. Em especial: ao Igor Silva por ter ajudado diretamente na execução de todas as etapas deste trabalho, independente da hora ou dia da semana; à equipe do histolab pela rapidez e eficiência na microtomia e colorações: Luzia Caputo, Luciana Souza e Luzia Barros; à equipe de apoio aos animais de laboratório: Iolanda Souza e Fatinha; à Juliane Siqueira pela ajuda fundamental com a imunofluorescência na etapa final da tese; à Thalita Paschoal pela ajuda com colorações, reagentes e pelo maravilhoso bolo de cenoura; ao Marcelo Barbosa pelo escaneamento das lâminas histológicas; ao Leonardo Oliveira, Márcia Terra, Yulinda maravilhosa, Jéssica Ferro, Pedro Paulo Manso, Bárbara Dias e Jackline Ayres pelo apoio em diversas atividades laboratoriais. Aos demais membros do labpat que ajudaram direta ou indiretamente na execução desse trabalho: Ester Mota, Andréa Natividade, Junior Costa, Alexandra Correa, Taty “Rosinha” e Mariana Rietmann.

À equipe do antigo Croy lab por terem me acolhido tão bem, pela troca de experiência e amizade: Ashley Martin, Allison Felker, Vanessa Kay, Shuhiba Mohammad, Ernesto Figueiro-Filho, Olivia Sohee Jeon, Danielle Mara, Andrew Hickman e Kenz Lynn.

Aos demais membros e amigos da Queen’s University que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução desse trabalho: Dr. Yat Tse, SooHyun Ahn, Stephany P. Monsanto, Dr. Michael Adams e Erin Burnett.

A todas as pessoas que ajudaram no processo de importação do material congelado do Canadá para o Brasil durante os quatro meses de negociação. Em especial aqueles que lidaram diretamente com questões burocráticas: Dr. Marcelo Pelajo Machado; Maurício Sérgio Marnet de Oliveira e equipe do Serviço de Importação e Exportação (SIEEX); Igor Silva; Dra. Anne Croy, Dr. Chandrakant Tayade, Ashley Martin, Kasra Khalaj, Dr. Yat Tse, Dr. Andrew Winterborn, Douglas MacLeod, Lilliana Restrepo e Ruth Lappan.

Agradeço ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIP-MED) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), especialmente à Dra. Márcia Pereira de Oliveira, pelo acesso ao criostato.

À Dra. Priscila Tavares Guedes pela amizade e por acreditar no meu trabalho.

À Fernanda Bottino por me ceder o anticorpo que eu precisava na reta final.

Ao Dr. David Natale (University of California, San Diego) por compartilhar seus conhecimentos e ajudar na escolha dos genes utilizados na análise de qPCR.

À Dra. Estela Bevilacqua, Dr. James Cross e Dr. Aplin por compartilhar seus conhecimentos em placenta e contribuir para construção do racional do trabalho.

Ao Tristan Forward pela torcida, companheirismo e paciência.

A todos os amigos que fiz nestes sete anos de FIOCRUZ, que com certeza vieram somar o meu processo de formação, seja discutindo ciência ou compartilhando momentos alegres e tristes da vida acadêmica.

Ao revisor desta tese, Dr. Vinícius Cotta de Almeida (chefe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do IOC/FIOCRUZ) por ter dedicado seu tempo à correção da tese.

Aos demais membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar esta tese, contribuindo para o prosseguimento do trabalho.

À equipe da coordenação e todos os professores de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz. Agradeço em especial a ajuda de custo para congressos nacionais e internacionais e à Julimar Loures da Silva Ferreira pela atenção e pelo secretariado eficiente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos no Canadá pelo Programa de Doutorado-sanduiche no Exterior (PDSE).

À Fundação Oswaldo Cruz, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada* (NSERC) e *Canada Research Chairs Program* pela ajuda financeira para a execução deste trabalho.

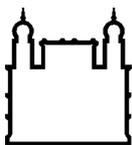
Meus sinceros agradecimentos.

“Without speculation, there is no good and original observation”

- Charles Darwin

“If you want to turn stem cells into the right cell types, you have to understand normal development”

- Janet Rossant



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

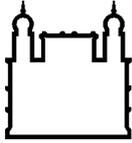
O PAPEL DA PLACENTA NA ONTOGENIA DO SISTEMA HEMATOPOÉTICO: ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E PERFIL FENOTÍPICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS COMPROMETIDAS COM A HEMATOPOESE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Nathália Azevedo Portilho

Apesar de alguns estudos terem identificado um potencial hematopoético da placenta humana e de camundongos, pouco se sabe sobre a real contribuição deste tecido na ontogenia do sistema sanguíneo e da vasculogênese. Nesse sentido, o grande impacto potencial dessa constatação contrasta com a escassez de artigos que falam sobre a hematopoese na placenta. Propusemo-nos então a realizar um estudo detalhado das células hematopoéticas da placenta de camundongos durante a metade da gestação identificando a sua topografia e nicho. O objetivo foi identificar prováveis arranjos hematopoéticos e vasculares bem como a identidade dos precursores e das células que compõem o microambiente indutor. Para isso, foram realizadas análises morfológicas da placenta de camundongos na metade da gestação através de técnicas de histologia convencional, imunofluorescência de tecidos e de *whole mount*. Foram analisados camundongos de diferentes linhagens incluindo Swiss Webster, C57BL/6 e camundongos *knockout* para o gene *Pgf* (*Pgf^{-/-}*). Foram realizadas também análises da expressão gênica de células após sua captura por microdissecção a laser e experimentos de enxerto subcapsular renal. Nestes, o cone ectoplacentário (EPC) de camundongos que expressavam GFP foi implantado abaixo da cápsula renal de camundongos receptores imunodeficientes. Foram identificados dois nichos principais na região de labirinto das placentas com 10,5 e 11,5 dias gestacionais, nos quais as células sanguíneas parecem se diferenciar por mecanismos distintos que ocorrem no mesmo período do desenvolvimento. Além de formar células tronco e progenitores hematopoéticos de forma distinta, a porção distal da placenta parece também induzir a proliferação destas células e ainda uma segunda onda de eritrócitos nucleados que atende ao rápido crescimento fetal dessa etapa da gestação. Algumas células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas e decíduais podem fornecer um nicho favorável à eritropoese. Foi observado uma forte associação entre as células hematopoéticas e endoteliais sugerindo uma origem comum a essas duas linhagens celulares. A imunofluorescência mostrou a transição epitélio-mesenquimal de algumas células espongiotrofoblásticas. O potencial intrínseco de transição epitélio-mesenquimal destas células bem como seu potencial de diferenciação em células hematopoéticas Runx1+ foi confirmado em experimentos de enxerto com o EPC, o tecido progenitor das células espongiotrofoblásticas. A análise dos camundongos *Pgf^{-/-}* reforçaram a teoria de que as linhagens hematopoéticas e endoteliais podem ser formadas *de novo* a partir de endotélio hemogênico. A análise da expressão gênica de células hematopoéticas microdissecadas não só ajudou na caracterização destas células na placenta como também confirmaram que algumas células espongiotrofoblásticas poderiam formar células sanguíneas por um mecanismo de diferenciação epitélio-mesenquimal-hematopoético.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

THE ROLE OF PLACENTA IN THE ONTOGENY OF HEMATOPOIETIC SYSTEM: ORIGIN, SPACIAL DISTRIBUTION AND PHENOTYPICAL AND GENE EXPRESSION PROFILE OF HEMATOPOIETIC CELLS

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Nathália Azevedo Portilho

Although previous studies identified a hematopoietic potential of mid-gestational human and mouse placentas, their contribution to hematopoietic ontogeny and vasculogenesis is not clear. In this sense, we decided to characterize hematopoietic cells in mouse placenta over midgestation, identifying their topography and niche. The objective was to seek the existence of hemangioblastic foci and independent vasculogenesis in mouse placenta at midpregnancy. In addition, to establish the origin of hematopoietic cells through graft and the differentiation potential of these placental cell lineages. We performed morphological *in situ* analysis of mouse placenta through histology, immunohistochemistry (IHC) and whole mount fluorescence techniques in wild type (C57BL/6 and Swiss Webster) and PGF knockout mice. We also performed qRT-PCR after Laser Capture Microdissection (LCM) and renal subcapsular grafts, in which ectoplacental cone (EPC) from a GFP-mouse was implanted underneath kidney capsule of an immunodeficient receptor mouse. Two transient, simultaneous major niches for hematopoietic cell development were identified in the labyrinth of mouse placenta at 10.5 and 11.5 gestational days. In addition to producing hematopoietic stem/progenitor cells by two mechanisms, different niches at distal part of labyrinthine placenta seem to induce proliferation and produce an independent wave of nucleated erythrocytes that may support the rapid mid-pregnancy fetal growth. Some trophoblast giant cells, spongiotrophoblast and decidual cells may offer an erythropoiesis-promoting niche. A close relationship was apparent between placental hematopoietic and endothelial cells, suggesting the existence of a bipotent precursor for these two lineages. IHC suggested a mesenchyme transition of some spongiotrophoblast cells. The grafts experiments confirmed the intrinsic ability of EPC (spongiotrophoblast progenitor) to form mesenchyme channels and differentiate into Runx1⁺ hematopoietic cells. Analysis in both wild type and PGF knockout mice suggested that both endothelial and hematopoietic lineages might arise *de novo* from components of spongiotrophoblast layer, through a hemogenic endothelium cell. Gene expression profile of hematopoietic cells after LCM confirm our hypothesis that some spongiotrophoblast cells were able to produce CD41⁺ hematopoietic cells through epithelial-mesenchyme-hematopoietic transition. Gene profile also elucidated some features of hematopoietic cells phenotype.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Hematopoese	21
1.1.1 Nichos hematopoéticos da medula óssea	22
1.1.2 Identificação das células tronco hematopoéticas.....	28
1.2 Ontogenia do sistema hematopoético	31
1.3 Hematopoese na placenta	43
1.3.1 A placenta.....	43
1.3.2 Formação da placenta em camundongos.....	44
1.3.3 Hematopoese na placenta	56
1.4 Justificativa	58
2 OBJETIVOS	60
2.1 Objetivo Geral	60
2.2 Objetivos Específicos	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 Animais	61
3.2 Análise morfológica	62
3.2.1 Coleta de tecidos para estudo histológico	62
3.2.2 Produção de blocos histológicos	63
3.2.3 Microtomia e coloração.....	64
3.2.4 Imunofluorescência: marcação simples.....	66
3.2.5 Imunofluorescência: dupla marcação	68
3.2.6 Análise, fotomicrografia e digitalização das lâminas.....	69
3.3 Técnica de fluorescência em <i>Whole Mount</i>	70
3.4 Imunohistoquímica e quantificação relativa das células CD41⁺ no labirinto da placenta	71
3.5 Administração de Eritropoetina humana recombinante (rhEPO) em fêmeas grávidas	72
3.6 Enxerto subcapsular renal	72
3.6.1 Acasalamentos	72

3.6.2	Preparo do enxerto: dissecação do cone ectoplacentário	73
3.6.3	Implante do EPC no espaço subcapsular renal do camundongo receptor	74
3.6.4	Coleta, processamento e análise do enxerto	74
3.7	Microdissecação a laser	76
3.8	Análise da expressão gênica do material microdissecado	78
3.8.1	Extração de RNA	78
3.8.2	Obtenção de cDNA	79
3.8.3	Expressão gênica por PCR em tempo real	79
3.8.4	Reação de qPCR em amostras de placenta total como controle das análises de material microdissecado	83
4	RESULTADOS	85
4.1	A morfologia da placenta de camundongos	85
4.2	Imunofluorescência da placenta murina na metade da gestação (10,5 e 11,5 dias gestacionais)	98
4.3	Hematopoese em vasos fetais do labirinto próximos à placa coriônica	102
4.4	Hematopoese na região de labirinto próxima à zona de junção	108
4.5	Células hematopoéticas imaturas presentes na placenta aos 9,5 e 12,5 dg	116
4.6	Eritropoese na região de labirinto próxima à zona de junção	119
4.7	Caracterização da eritropoese placentária após a administração de eritropoetina exógena	125
4.8	Transição epitélio-mesenquimal de células espongiotrofoblásticas	132
4.9	Importância do PGF na vasculogênese no labirinto da placenta	146
4.10	Enxerto subcapsular renal	156
4.11	Outros tecidos extraembrionários e fetais	165
4.12	Expressão gênica de células CD41 ⁺ após captura por microdissecação a laser (LCM)	175
5	DISCUSSÃO	182
5.1	Visualização e caracterização das células hematopoéticas na placenta de camundongos	185

5.1.1	Hematopoese na placa coriônica e nos vasos fetais do labirinto próximos a essa região	185
5.1.2	Hematopoese nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção	189
5.1.3	Eritropoese nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção	192
5.1.4	Hematopoese <i>de novo</i> nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção	195
5.2	Células Tpbpa⁺ derivadas do cone ectoplacentário como precursores do endotélio hemogênico e das células imunoblastoides na porção distal do labirinto	197
5.3	Influência de PGF na vasculogênese e hematopoese na placenta..	203
5.4	Existência de micronichos hematopoéticos na placenta	207
5.5	Perfil molecular das populações de células hematopoéticas CD41⁺ da placenta	209
6	CONCLUSÕES	222
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224
8	ANEXOS	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Nichos das Células Tronco Hematopoéticas na medula óssea adulta.....	23
Figura 1.2. A estrutura complexa do nicho endosteal contendo algumas das moléculas de sinalização que regulam as células tronco hematopoéticas nesse local.....	24
Figura 1.3. Células e moléculas de sinalização dos espaços extravasculares compõem o nicho vascular.	26
Figura 1.4. Alguns marcadores imunofenotípicos das células hematopoéticas imaturas de camundongos.....	30
Figura 1.5. Eritropoese primitiva no saco vitelínico de camundongos	33
Figura 1.6. Desenvolvimento da hematopoese primitiva e definitiva	39
Figura 1.7. Ontogenia do sistema hematopoético de camundongo: constituição e regulação das células hematopoéticas nos diferentes sítios	41
Figura 1.8. Anatomia comparada da placenta hemocorial humana (A-C) e de camundongos (D-F)	44
Figura 1.9. Do zigoto à formação do blastocisto	46
Figura 1.10. Morfogênese do córion e do labirinto	49
Figura 1.11. Morfogênese do labirinto.....	51
Figura 1.12. Estrutura da placenta de camundongos na metade da gestação mostrando a localização das células trofoblásticas gigantes (TGC) delimitando espaços de sangue materno	54
Figura 1.13. Organização contracorrente das circulações maternal e fetal da placenta.....	56
Figura 3.1. Dissecção do cone ectoplacentário (EPC).....	73
Figura 3.2. Instrumentos da microdissecção a laser	78
Figura 4.1.1. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 9,5 dg	88
Figura 4.1.2. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 10,5 dg	90
Figura 4.1.3. Placenta de camundongo C57BL/6 (B6) aos 10,5 dg	92
Figura 4.1.4. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 11,5 dg	94
Figura 4.1.5. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 12,5 dg	96
Figura 4.2.1. Identificação de células trofoblásticas da placenta de camundongos aos 10,5 dg	100

Figura 4.2.2. Detecção de células endoteliais na placenta de camundongos aos 10,5 dg.....	101
Figura 4.3.1. Brotamentos intraluminais de clusters de células hematopoéticas imaturas	104
Figura 4.3.2. Imunofluorescência em Whole Mount dos brotamentos hematopoéticos intraluminais.....	105
Figura 4.3.3. Fenótipo das células hematopoéticas circulantes de morfologia similar às células dos clusters – Marcadores de células hematopoéticas imaturas	106
Figura 4.3.4. Fenótipo das células hematopoéticas circulantes de morfologia similar às células dos clusters – Marcadores de células hematopoéticas imaturas II	107
Figura 4.4.1. Células hematopoéticas imunoblastoides.....	110
Figura 4.4.2. Heterogeneidade dos clusters hematopoéticos imunoblastoides	111
Figura 4.4.3. Fenótipo das células hematopoéticas imunoblastoides e clusters.....	112
Figura 4.4.4. Expressão de vWF nas células imunoblastoides e clusters	113
Figura 4.4.5. Distribuição espacial de células imaturas no labirinto que expressam vimentina.....	114
Figura 4.4.6. Brotamento intraluminal de células hematopoéticas imunoblastoides.....	115
Figura 4.5.1. Células hematopoéticas imaturas aos 9.5 dg	117
Figura 4.5.2. Expressão de vWF nas células hematopoéticas imaturas aos 12.5 dg.....	118
Figura 4.6.1. Focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção - I.....	121
Figura 4.6.2. Focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção - II.....	122
Figura 4.6.3. Imunofluorescência para caracterização da eritropoese.....	123
Figura 4.6.4. Detecção de eritropoetina na placenta de camundongos	124
Figura 4.7.1. Placenta de camundongos aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg.....	127
Figura 4.7.2. Focos eritropoéticos da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg.....	128

Figura 4.7.3. Imunofluorescência da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg - I.....	129
Figura 4.7.4. Imunofluorescência da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg - II.....	130
Figura 4.7.5. Placenta de camundongos aos 11,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg.....	131
Figura 4.8.1. Detecção de Vimentina em células espongiotrofoblásticas reveladas pela expressão de Tpbpa	135
Figura 4.8.2. Detecção de Vimentina	136
Figura 4.8.3. Detecção de Vimentina e CD31 na zona de junção.....	137
Figura 4.8.4. Distribuição espacial de vimentina: do espongiotrofoblasto até células hematopoéticas do labirinto	138
Figura 4.8.5. Sequência morfológica de diferenciação hematopoética.....	139
Figura 4.8.6. Células hematopoéticas e trofoblásticas	140
Figura 4.8.7. Expressão de VEGF	141
Figura 4.8.8. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 9,5 dg	142
Figura 4.8.9. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 12,5 dg	143
Figura 4.8.10. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 14,5 dg.....	145
Figura 4.9.1. Placentas de camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>).....	148
Figura 4.9.2. Região de labirinto das placentas de camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>).....	150
Figura 4.9.3. Comparação do número relativo de células CD41 ⁺ no labirinto das placentas de camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>) e controle C57Bl/6 (B6).....	151
Figura 4.9.4. Expressão de CD71 na placentas de camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>) e controle C57Bl/6 (B6).....	152
Figura 4.9.5. Imunofluorescência em camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>) - I.....	153
Figura 4.9.6. Imunofluorescência em camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{f/-}</i>) - II.....	154

Figura 4.9.7. Imunofluorescência em camundongos knockout para o Fator de Crescimento Placentário (<i>Pgf^{-/-}</i>) - III.....	155
Figura 4.10.1. Aspecto histológico do enxerto subcapsular renal.....	159
Figura 4.10.2. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: citoqueratina-8 e Tpbpa.....	160
Figura 4.10.3. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: vimentina.	161
Figura 4.10.4. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: CD31.....	162
Figura 4.10.5. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: vWF	163
Figura 4.10.6. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: Runx1	164
Figura 4.11.1. Saco vitelínico e aorta dorsal aos 9,5 dg	167
Figura 4.11.2. Saco vitelínico aos 10,5 dg	168
Figura 4.11.3. Fenótipo das células imaturas no saco vitelínico aos 10,5 dg..	169
Figura 4.11.4. Vasos intraembrionários e umbilicais aos 10,5 dg.....	170
Figura 4.11.5. Fenótipo das células imaturas dos vasos intraembrionários aos 10,5 dg- I.....	171
Figura 4.11.6. Fenótipo das células imaturas dos vasos intraembrionários aos 10,5 dg- II.....	172
Figura 4.11.7. Fígado fetal aos 10,5 dg	173
Figura 4.11.8. Fenótipo das células imaturas no fígado fetal na metade da gestação.....	174
Figura 4.12.1. Microdissecção a laser de células CD41 ⁺ da região de labirinto da placenta de camundongos	178
Figura 4.12.2. Captura de duas subpopulações de células CD41 ⁺ por microdissecção a laser	179
Figura 4.12.3. Heatmaps representativos de todos os genes	180
Figura 4.12.4. Heatmaps representativos dos perfis gênicos.....	181

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Anticorpos primários e lectina utilizados na imunomarcação.....	67
Tabela 3.2. Anticorpos secundários utilizados na imunomarcação	68
Tabela 3.3. Genes e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Os três últimos genes relacionados, aqui sombreados, foram desenhados como normalizadores	80
Tabela 4.1. Resumo dos experimentos de enxerto de cone ecoplacentario (EPC) sob a cápsula renal de camundongos fêmeas grávidas Rag ^{-/-} γc ⁻	156
Tabela 4.2. Informações da microdissecção a laser das células CD41 ⁺	176

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang-1	Angiopietina-1
B6	C57BL/6
Balbc-GFP	camundongos BALB/c-Tg(UBC-GFP)30Scha/J
BFU-E	<i>Burst Forming Units-Erythrocyte</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina de soro fetal bovino)
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unidade Formadora de Colônia)
CFU-S	<i>Colony Forming Unit Spleen</i> (Unidade formadora de colônia no baço)
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i> (Progenitor linfoide comum)
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de colônias)
CTE	Células Citotrofoblásticas Extravilosas
CTG	Células Trofoblásticas Gigantes
CTG-C	Células Trofoblásticas Gigantes associadas aos canais
CTG-Ch	Células Trofoblásticas Gigantes associadas a tuneis
CTG-P	Células Trofoblásticas Gigantes Parietais
CTG-S	Células Trofoblásticas Gigantes associadas a sinusoides
CTG-SpA	Células Trofoblásticas Gigantes associadas às artérias espiraladas
CTH	Células Tronco Hematopoéticas
CTPH	Células Tronco e Progenitores Hematopoéticos
Ctsq	<i>Cathepsin Q</i>
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i> (Quimiocina C-X-C 12); <i>sin.SDF1</i>)
CXCR4	<i>C-X-C Chemokine Receptor type 4</i> (Receptor 4 de quimiocina C-X-C)
CXCR7	<i>C-X-C Chemokine Receptor type7</i> (Receptor 7 de quimiocina C-X-C)
DAB	3,3-diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamidino-2- fenilindol
dg	dias gestacionais
EPC	Ectoplacental cone (Cone ectoplacentário)
EPO	Eritropoetina
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Gcm	<i>Glial cells missing</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> (Fatores estimuladores de colônias granulocíticas)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)

GM-CSF	<i>Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fatores estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HPP-CFU	<i>High Proliferative Potential - Colony Forming Unit</i> (Unidade formadora de colônia com grande potencial proliferativo)
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (fator de crescimento semelhante à insulina)
ihh	Indian Hedgehog
Itga4	gene que codifica a cadeia α4 de integrina
KSL	c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lin ⁻
LABPAT/IOC	Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i> (microdissecção a laser)
lin	define o conjunto de marcadores de linhagens celulares hematopoéticas comprometidas
LT-HSC	<i>Long-Term Hematopoietic Stem Cells</i> (Células tronco hematopoéticas de longo prazo)
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fatores estimuladores de colônias de macrófagos)
MPP	<i>Multipotent Progenitor</i> (Progenitor multipotente)
NK	<i>Natural Killer</i>
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i> (temperatura ótima de corte)
PBA	PBS + BSA 1% + Azida sódica 1%
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PDGF-B	<i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>
PFA	Paraformaldeído
PGF	<i>Placental Growth Fator</i> (Fator de crescimento placentário)
<i>Pgf^{-/-}</i>	camundongos C57BL6 <i>PGF^{-/-}</i>
PNA	<i>Peanut agglutinin</i> , Lectina isolada de <i>Arachis hypogaea</i>
primers	Oligonucleotídeos iniciadores
Prl2c2	Plf
Prl3b1	Pl2
Prl3d1	Pl1
<i>Rag^{-/-}γc⁻</i>	camundongos BALB/c- <i>Rag2^{-/-}γc⁻</i>

Rag2	<i>Recombinase activating gene-2</i>
rhEPO	<i>Recombinant human Erythropoietin</i> (Eritropoetina humana recombinante)
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
sinc-I	Sinciciotrofoblasto I
sinc-II	Sinciciotrofoblasto II
ST-HSC	<i>Short-Term Hematopoietic Stem Cells</i> (Células tronco hematopoéticas de curto prazo)
SW	Swiss Webster
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Tpbpa	<i>Trophoblast specific protein alpha</i> (Proteína alfa específica de trofoblasto); <i>sin.</i> 4311
UACC	<i>University Animal Care Committee</i>
uNK	<i>Natural Killer</i> uterinas
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1; <i>sin.</i> FLT-1
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor receptor 2; <i>sin.</i> KDR; Flk-1
vWF	<i>von Willebrand Factor</i> (Fator de von Willebrand)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese

A hematopoese é o processo de formação de todas as células maduras do sangue. Em mamíferos, as células sanguíneas compreendem eritrócitos, responsáveis principalmente pelo transporte de oxigênio, megacariócitos e plaquetas, importantes para hemostasia, e células da linhagem mieloide e linfoide que são fundamentais para a resposta imunológica dos indivíduos, como monócitos/macrófagos, granulócitos, mastócitos, linfócitos T e B, bem como células dendríticas e *natural killer* (NK) (Beerman et al, 2017; Heinig et al, 2015; Seita & Weissman, 2010). Apesar de extremamente importantes para garantir o bom funcionamento do organismo, grande parte destas células possui um tempo de vida limitado, precisando ser constantemente renovada para manter a homeostase do sistema sanguíneo. Sendo assim, a produção das células do sangue deve ocorrer durante toda a vida do indivíduo, o que é feito a partir de células tronco hematopoéticas (CTH). As CTH consistem em uma população rara de células multipotentes que residem principalmente na medula óssea durante a vida adulta da maioria dos vertebrados (Cumano & Godin, 2007; Heinig et al, 2015; Orkin & Zon, 2008). Elas são fundadoras de um sistema hierárquico no qual além da autorrenovação, se diferenciam em diversos progenitores intermediários que à medida que proliferam, restringem gradativamente o potencial de diferenciação até assumir a forma madura (Ciau-Uitza et al, 2014).

A medula óssea é o principal sítio de hematopoese da maioria dos mamíferos adultos, incluindo humanos e roedores. Ela possui uma estrutura complexa formada por uma rede de vasos sanguíneos e diversas células mesenquimais e hematopoéticas. Os vasos sanguíneos da medula óssea podem ser do tipo arteríolas ou sinusoides, cada um contendo células endoteliais com diferentes propriedades. Entre as células mesenquimais encontram-se células tronco e progenitores, bem como células diferenciadas como adipócitos e células das linhagens osteoblástica e condrocítica (Beerman et al, 2017). As células mesenquimais e vasos sanguíneos da medula óssea se organizam em microambientes especializados que abrigam as CTH e favorecem a hematopoese,

sendo chamados de nichos hematopoéticos. Os nichos hematopoéticos têm importância fundamental pois devem permitir não só a diferenciação das CTH em células maduras do sangue como também devem manter a capacidade destas células de autorrenovação e multipotencialidade. Assim, garantem um estoque de células capazes de restituir a hematopoese durante toda a vida do indivíduo (Beerman et al, 2017; Pel et al, 2016; Zhao & Li, 2016). Essas propriedades das CTH são mantidas nos nichos da medula óssea, seja por contato célula-célula ou pela interação com a matriz extracelular, fatores de crescimento e quimiocinas produzidas pelas células endoteliais ou mesenquimais, ou ainda sob influência de outras células hematopoéticas, como megacariócitos e macrófagos (Pel et al, 2016).

Como acontece nas células tronco de diferentes tecidos do organismo adulto, acredita-se que na medula óssea existam pelo menos dois tipos principais de nichos que influenciam as CTH de forma diferente. Um deles seria responsável por manter um reservatório de CTH em estado quiescente, para o qual fatores produzidos por células especializadas agiriam de forma a reprimir a divisão celular e diferenciação das CTH. Esse estado de quiescência poderia ser revertido em situações de estresse ou lesões graves do organismo. Em contrapartida, um segundo nicho favoreceria a autorrenovação das CTH ao invés de quiescência. Nesse caso, as células-tronco resultantes das divisões de autorrenovação poderiam eventualmente adquirir uma posição mais periférica do nicho e receber sinais externos que estimulassem uma divisão celular assimétrica e/ou o início da diferenciação para determinada linhagem celular específica. Esse mecanismo seria importante para manter a homeostase do sistema sanguíneo ao promover a renovação das células do sangue mantendo o pool de CTH (Gilbert, 2003; Wilson & Trumpp, 2006).

1.1.1 Nichos hematopoéticos da medula óssea

A existência de nichos na medula óssea que preservem as características das CTH foi proposta inicialmente por Schofield em 1978. Neste trabalho, o autor sugeriu que células da medula óssea permitem a expansão das CTH sem induzir a sua diferenciação (Schofield, 1978). Com o uso de ferramentas mais modernas e diferentes modelos animais, o nicho hematopoético da medula óssea vem sendo caracterizado aos poucos. Tradicionalmente acredita-se que neste órgão os dois

nichos hematopoéticos principais seriam o nicho endosteal e o nicho vascular (Fig. 1.1).

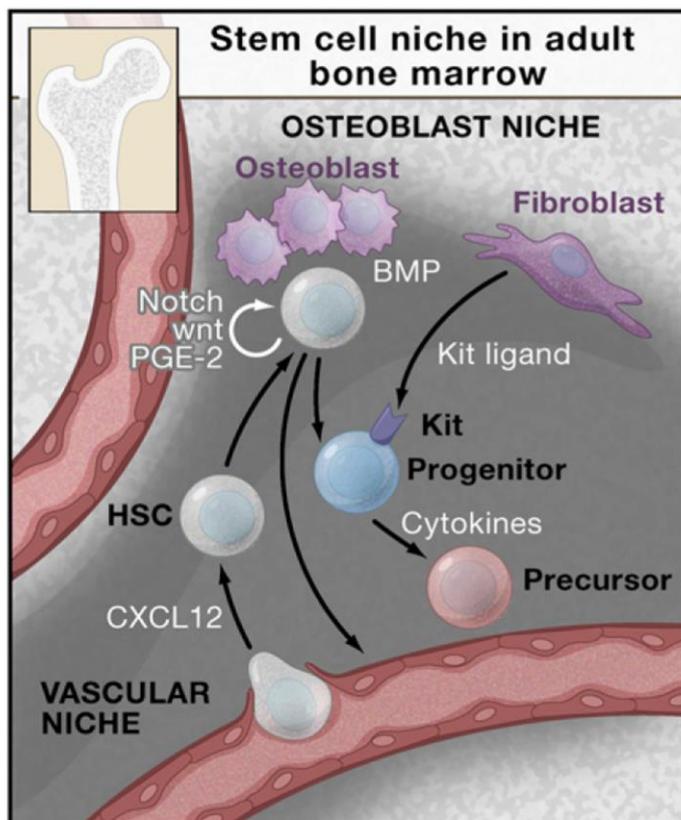


Figura 1.1. Nichos das Células Tronco Hematopoéticas na medula óssea adulta. No nicho osteoblástico (*Osteoblast niche*) as HSC ficam próximas aos osteoblastos e são reguladas pelo BMP. As HSC do nicho vascular (*Vascular niche*) ficam próximas aos vasos sanguíneos. A quimiocina CXCL12 é produzida por diversas células da medula óssea e regula a migração das HSC da circulação sanguínea para esse nicho local (*homing*). Os dois nichos ficam próximos e podem se interconectar. Outras células estromais da medula óssea podem influenciar a hematopoese ao produzir diferentes enzimas, como, por exemplo SCF (*Kit ligand*), que estimula as HSC e precursores hematopoéticos. Extraído de Orkin e Zon (2008).

O nicho endosteal fica localizado na superfície interna do revestimento ósseo. O endóstio é formado principalmente por osteoblastos (células mesenquimais que formam osso), osteoclastos (células multinucleadas derivadas de macrófagos e com atividade fagocitária) e fibroblastos (Tamma & Ribatti, 2017b; Wilson & Trumpp, 2006). Um tipo específico de osteoblasto, mais imaturo e fusiforme, foi demonstrado ser essencial para manter as CTH aderidas ao endóstio em estado quiescente através de interações homotípicas de N-caderina (Arai et al, 2012; Calvi et al, 2003; Zhang et al, 2003). Sendo assim, os osteoblastos seriam os principais componentes do nicho endosteal, o qual por sua vez, abrigaria um reservatório de CTH em estado quiescente, somente sendo ativadas em casos de uma quebra de equilíbrio do sistema sanguíneo. Outras moléculas de superfície dos osteoblastos e das CTH também estão envolvidas na regulação das CTH no nicho endosteal. Entre elas, a ligação de angiopoietina-1 (Ang-1), expressa nos osteoblastos, com o receptor de angiopoietina Tie2 (Zhang et al), expresso nas CTH desta região, mantém a quiescência das CTH, além de proteger e aumentar a sobrevivência destas células (Arai et al, 2004; Tamma & Ribatti, 2017b). O CXCL12 (do inglês *C-X-C Motif Chemokine*

Ligand12) é uma molécula com propriedades quimioatrativas que é amplamente expressa na medula óssea e está envolvida em diversas propriedades das células hematopoéticas. No nicho endosteal, este fator é expresso nos osteoblastos imaturos e auxilia a manutenção das CTH neste local (Nakamura et al, 2010; Tamma & Ribatti, 2017b). Algumas das moléculas de sinalização produzidas pelas células do nicho endosteal estão representadas na Fig. 1.2.

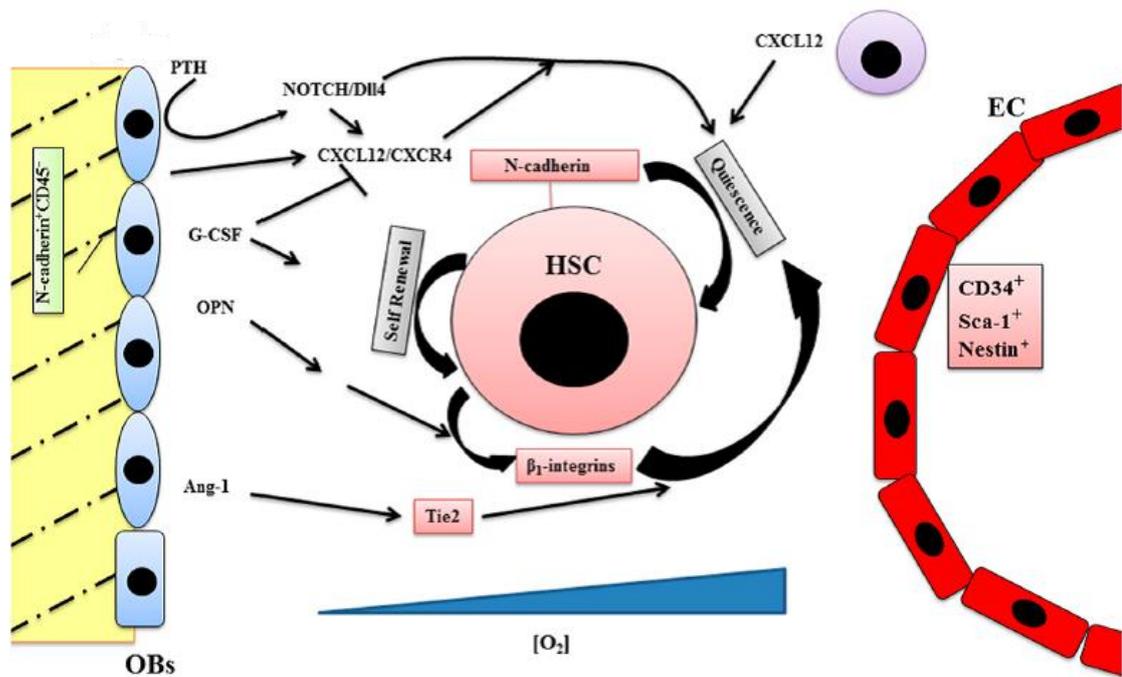


Figura 1.2. A estrutura complexa do nicho endosteal contendo algumas das moléculas de sinalização que regulam as células tronco hematopoéticas nesse local. Osteoblastos (OBs), células endoteliais (EC), Células tronco hematopoéticas (HSC), *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), osteopontina (OPN), Hormônio paratireoide (PTH), Ligante tipo delta (DII4), CXCR4, CXCL12, Tie2, Ang-1, Notch. Triângulo azul: gradiente de oxigênio. Extraído de Tamma e Ribatti (2017b).

As CTH também foram identificadas fazendo contato com as células endoteliais dos vasos sanguíneos, sugerindo um segundo nicho hematopoético de posição mais central na medula óssea, conhecido como nicho vascular (Kiel et al, 2005). Uma vez que CTH mitoticamente ativas foram encontradas junto com CTH quiescentes no nicho vascular, foi sugerido que esse nicho seja favorável à autorrenovação das CTH sendo, portanto, importante para o aumento do *pool* destas células. Acredita-se que a autorrenovação das CTH no nicho vascular eventualmente realize divisões celulares assimétricas que produzem progenitores multipotentes, os MPP (do inglês *Multipotent Progenitor*), além de células tronco. Os MPP perdem a sua capacidade de autorrenovação a longo prazo embora ainda

mantenham o seu potencial de diferenciação multilinhagem. No nicho vascular, esses progenitores se expandem e diferenciam em células da linhagem megacariocítica e mieloide (Seita & Weissman, 2010; Wilson & Trumpp, 2006). Os MPP também podem dar origem a precursores linfoides comuns, os CLP (do inglês *Common Lymphoid Progenitor*), que na medula óssea irão se diferenciar em progenitores de linfócitos B quando próximos a células estromais que expressem CXCL12 (Wilson & Trumpp, 2006). Alternativamente, os CLP podem cair na corrente sanguínea e migrar para o timo onde se diferenciam em progenitores de linfócitos T (Seita & Weissman, 2010). Evidências recentes sugerem ainda que, além dos progenitores comuns, as CTH podem dar origem diretamente a progenitores restritos a determinada linhagem (Ng & Alexander, 2017). Em conjunto, enquanto o nicho endosteal favorece a quiescência das CTH, o nicho vascular é um local importante para a proliferação e manutenção das células tronco, podendo ou não iniciar a sua diferenciação (Tamma & Ribatti, 2017b).

A hematopoese vascular ocorre nos espaços extravasculares entre os vasos sinusoides da medula óssea. Nestes vasos, tanto as células endoteliais quanto as células do estroma adjacente produzem altas quantidades de CXCL12, enquanto as CTH expressam o receptor CXCR4 (do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*). A ligação de CXCL12 com CXCR4 é importante para diversas propriedades das células hematopoéticas, como sobrevivência, mobilização para a corrente sanguínea e *homing* das CTH para a medula óssea (Sugiyama et al, 2006; Tamma & Ribatti, 2017b). Outros fatores são produzidos em ambos os nichos, mas são encontrados em diferentes concentrações em cada um deles, de forma que influenciam o comportamento das CTH e a hematopoese de forma diferente. Por exemplo, membros da superfamília do TGF- β (do inglês *Transforming Growth Factor β*) regulam a expressão de vários receptores que controlam a biologia das CTH. As BMPs (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*) são membros da superfamília TGF- β e influenciam as CTH de diversas formas (Scandura et al, 2004; Tamma & Ribatti, 2017a). Altas concentrações de BMP4 influenciam a sobrevivência celular, enquanto baixas concentrações deste fator estimulam a proliferação e diferenciação (Tamma & Ribatti, 2017b). Outro fator extremamente importante para a proliferação e diferenciação das CTH produzido pela medula óssea é o SCF (do inglês *Stem Cell Factor*). Algumas das moléculas de sinalização que são produzidas pelas células do nicho vascular estão representadas na Fig. 1.3.

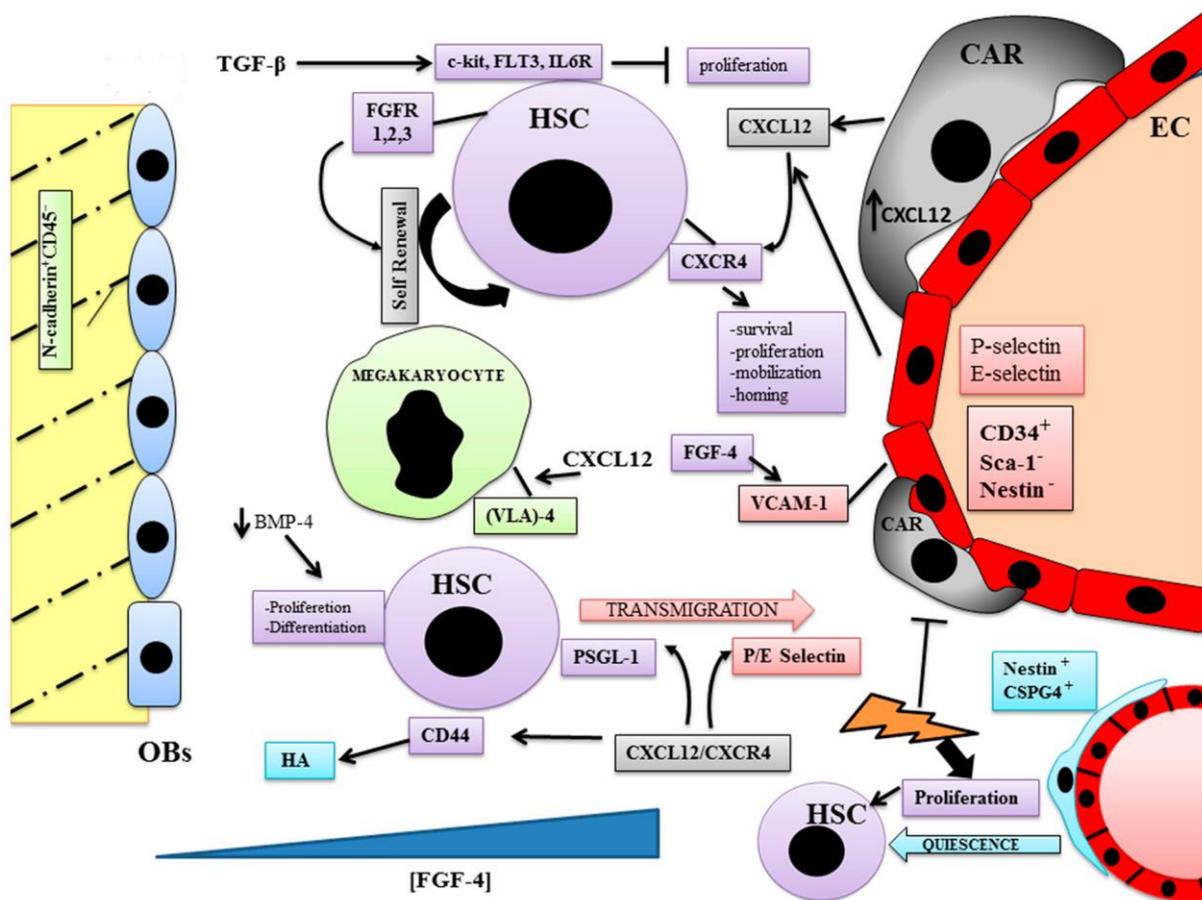


Figura 1.3. Células e moléculas de sinalização dos espaços extravasculares compõem o nicho vascular. Diferentes células e moléculas de sinalização influenciam as propriedades das células tronco hematopoéticas (HSC). Os vasos são envolvidos por células adventícias conhecidas como células reticulares abundantes em CXCL12 (CAR). A proximidade das CTH com o endotélio dos sinusoides é importante para sua maturação e hematopoese. Próximo ao nicho arteriolar encontram-se CTH quiescentes associadas a uma CAR diferente conhecida como células peri-arteriolas (Nestina⁺). Estas células expressam sulfato de condroitina proteoglicana-4 (CSPG4), possuem quimiorresistência após lesões genotóxicas e também ativam a proliferação das CTH. Osteoblastos (OBs), células endoteliais (EC), receptores de FGF (FGFRs), TGFβ, BMP, ácido hialurônico (HA), ligante de glicoproteína (PSGL-1), VLA-4 (*very late antigen-4*), CSPG4, FGF4, selectinas P e E (P/E selectin), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*), Flt3, receptor de interleucina 6 (Il6R). Triângulo azul: gradiente de FGF-4. Raio: estimulação genotóxica. Extraído de Tamma e Ribatti (2017b).

Ainda não se sabe se as CTH do nicho vascular sozinhas são suficientes para manter o grande *turnover* de células do sangue. Entretanto, acredita-se que ocorra um intercâmbio de células entre os nichos endosteal e vascular e, nesse sentido, poderia ocorrer a migração de CTH do nicho endosteal para o nicho vascular que contribuem para a produção de células que mantêm a homeostase do organismo. O FGF (do inglês *Fibroblast Growth Factor*) é um forte candidato a mediador dessa comunicação de células entre os dois nichos da medula óssea. Foi encontrado um gradiente de expressão de FGF, no qual ele é menos expresso no nicho endosteal enquanto ele é altamente expresso no nicho vascular, o que poderia influenciar o

recrutamento de CTH e/ou progenitores para o nicho vascular (Fig. 1.3) (Wright et al, 2001). O gradiente de oxigênio também foi relacionado a uma maior concentração de CTH em estado de quiescência próxima ao nicho endosteal (onde os níveis de oxigênio são menores) em relação às células mitoticamente ativas distribuídas na porção mais central da medula óssea (região com maiores níveis de oxigênio) (Fig. 1.2) (Nilsson et al, 2001).

Apesar de a existência dos nichos endosteal e vascular na medula óssea ser bem reconhecida, novos trabalhos e metodologias vêm mostrando que o nicho hematopoético da medula óssea pode ser muito mais complexo. Novos tipos celulares e até mesmo o sistema nervoso simpático parecem estar envolvidos na manutenção do nicho das células tronco junto com os osteoblastos e células endoteliais (Méndez-Ferrer et al, 2010; Pel et al, 2016). Ainda, diferenças na composição dos vasos sanguíneos da medula óssea, tanto no que diz respeito às células endoteliais quanto às células que envolvem os vasos, parecem estar relacionadas a diferentes sinais indutores para a hematopoese (Fig. 1.3) (Itkin et al, 2016). Além de manter a hematopoese, diferentes composições de células e fatores de crescimento do estroma da medula óssea contribuem para a diferenciação de determinadas linhagens celulares. Ainda não se sabe como ocorre a distribuição desses nichos pela medula óssea, mas parece estar relacionada com a concentração e proximidade das células tronco e progenitores hematopoéticos (CTPH) com fatores produzidos pelas células estromais e matriz extracelular. Citocinas como SCF, ligantes de Notch, BMP, FGF e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) mantêm as propriedades de autorrenovação e multipotencialidade das CTH, enquanto a diferenciação e comprometimento com determinada linhagem é influenciado por citocinas como fatores estimuladores de colônias (CSF, do inglês *Colony Stimulating Factor*) granulocíticas (G-CSF), de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de macrófagos (M-CSF), interleucina-7 (IL7) e eritropoetina (Benz et al). Em conjunto, a medula óssea contém diversos micronichos essenciais para a manutenção das propriedades das CTH e também para a diferenciação final de precursores de determinadas linhagens dentro das especificidades dos nichos endosteal e vascular (Kim, 2010; Zhang & Lodish, 2008). É importante ressaltar que os nichos hematopoéticos da medula óssea de humanos e de murinos são bastante semelhantes (Pel et al, 2016).

Apesar de a medula óssea ser o principal local de hematopoese durante a vida adulta, hematopoese extramedular pode ser observada durante algumas alterações hematológicas benignas e malignas (Yamamoto et al, 2016). O fígado e o baço são os principais órgãos de hematopoese extramedular, embora esse processo tenha sido relatado também em outros locais como: pulmões, rins, cavidade peritoneal e linfonodos, entre outros (Kim, 2010). Tanto o fígado quanto o baço possuem atividade hematopoética durante a vida embrionária, podendo retomar essa atividade em resposta a determinadas patologias (Golub & Cumano, 2013). A hematopoese ectópica no fígado é observada no interior dos sinusoides hepáticos enquanto no baço ocorre principalmente na polpa vermelha (Yamamoto et al, 2016). Apesar de não substituírem a medula óssea quanto à complexidade de células produzidas, esses sítios são importantes para suplementar essa produção celular frente a perturbações da homeostasia sanguínea. O caso mais comum é a eritropoese ectópica em resposta ao aumento da produção de eritropoetina em situações de hipóxia prolongada devido à redução do número de hemácias circulantes (Kim, 2010). Se o número de granulócitos e plaquetas também estiver abaixo do normal, eles também podem ser produzidos em outros locais que não a medula óssea. Em resposta a infecções e inflamação, por exemplo, células fagocíticas e apresentadoras de antígenos são produzidas pelo fígado e/ou baço. Entretanto, a hematopoese extramedular pode ser decorrente de condições malignas, nas quais o nicho da medula óssea não é capaz de sustentar a hematopoese forçando a saída das CTPH (Kim, 2010; Yamamoto et al, 2016). Entre outros fatores, acredita-se que o CXCL12 seja produzido pelo endotélio do fígado e baço nos casos de quebra da homeostasia sanguínea e contribui para a migração dos progenitores hematopoéticos da medula óssea (Kim, 2010). Apesar de o baço ser comumente descrito como um importante órgão para hematopoese extramedular, acredita-se que ele realize eritropoese também em condições fisiológicas normais, ainda que em baixos níveis (Kim, 2010).

1.1.2 Identificação das células tronco hematopoéticas

Experimentos de transplantação realizados na década de 1960 revelaram a presença de células tronco hematopoéticas multipotentes e de longa duração, as LT-HSC (do inglês *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*), na medula óssea de

camundongos (Till & McCulloch, 1961). Estes experimentos consistiram na infusão intravenosa de células da medula óssea de camundongos adultos saudáveis em camundongos isogênicos previamente irradiados. Os autores observaram a formação de nódulos esplênicos nos animais receptores proporcionais ao número de células infundidas, os quais eram compostos por células sanguíneas imaturas e células diferenciadas de distintas linhagens. Trabalhos subsequentes do mesmo grupo confirmaram a existência de uma célula hematopoética multipotente na medula óssea capaz de formar colônias clonogênicas no baço de animais receptores, as quais foram denominadas de Unidade Formadora de Colônia no Baço (CFU-S, do inglês *Colony Forming Unit Spleen*) (Abramson et al, 1977; Becker et al, 1963; Till & McCulloch, 1961; Wu et al, 1967). Até hoje prevalece a teoria de que a medula óssea dos indivíduos adultos contém uma população de LT-HSC com capacidade de autorrenovação e multipotencialidade, na qual uma única célula é capaz de se diferenciar em MPP de curta duração, que também são conhecidos como ST-HSC (do inglês *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*). Esses dão origem a progenitores mais restritos a determinada linhagem que finalmente dão origem a todo sistema sanguíneo (Cavazzana-Calvo et al, 2011).

Em humanos, estima-se que apenas uma a cada 10.000 células da medula óssea sejam LT-HSC (Novershtern et al, 2011). A identificação e caracterização das CTH são dificultadas pela ausência de marcadores específicos para isolar essa população de células raras na medula óssea. Sendo assim, ainda que diferentes marcadores venham sendo identificados, o método mais confiável para detectar as CTH continua sendo ensaios funcionais que demonstrem as propriedades de regeneração do sistema hematopoético destas células ao invés de métodos de detecção mais diretos. As células LT-HSC são aquelas capazes de recuperar o sistema hematopoético em pelo menos dois animais diferentes em transplantes seriados (Babovic & Eaves, 2014; Ng & Alexander, 2017). Além dos ensaios funcionais *in vivo* semelhantes àqueles realizados na década de 1960, ensaios funcionais *in vitro* também são empregados para detectar as CTH. Estes ensaios identificam e quantificam a capacidade de uma única célula em formar colônias de células de diferentes linhagens e com grande potencial proliferativo. A composição das colônias formadas identifica o potencial multipotente ou restrito das unidades formadoras de colônia, CFU (do inglês *Colony Forming Units*), como são chamadas estas células. Por sua vez, a autorrenovação a longo prazo é identificada entre as

CFUs com alto índice proliferativo após 60 dias em cultura (HPP-CFU, do inglês *High Proliferative Potential*) (Cumano & Godin, 2007; Gunsilius et al, 2001).

Na ausência de um marcador específico para as CTH, são utilizados diversos marcadores de superfície combinados para identificar e isolar as CTH e progenitores multipotentes. Apesar de as células obtidas dessa forma serem enriquecidas em CTH e MPP, elas continuam sendo funcionalmente heterogêneas e ensaios funcionais são necessários para definir as CTH (Challen et al, 2009; Oguro et al, 2013). Os marcadores mais comuns para purificar CTH de camundongos são c-Kit e Sca1, que são combinados com a seleção negativa de marcadores de linhagens celulares (lin). Cerca de 10% das células c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ (KSL) são CTH potenciais e, nesse sentido, outros marcadores são adicionados à seleção KSL para enriquecer a população de CTH (Challen et al, 2009; Ng & Alexander, 2017). Nesse sentido, a descoberta dos marcadores da família SLAM (CD150, CD48, CD229, e CD244) vem sendo bastante útil para ajudar a purificar as CTH (Kiel et al, 2005; Oguro et al, 2013). O problema, entretanto, é que a combinação de marcadores utilizados pode variar entre os laboratórios. Alguns destes marcadores estão representados na figura 1.4.

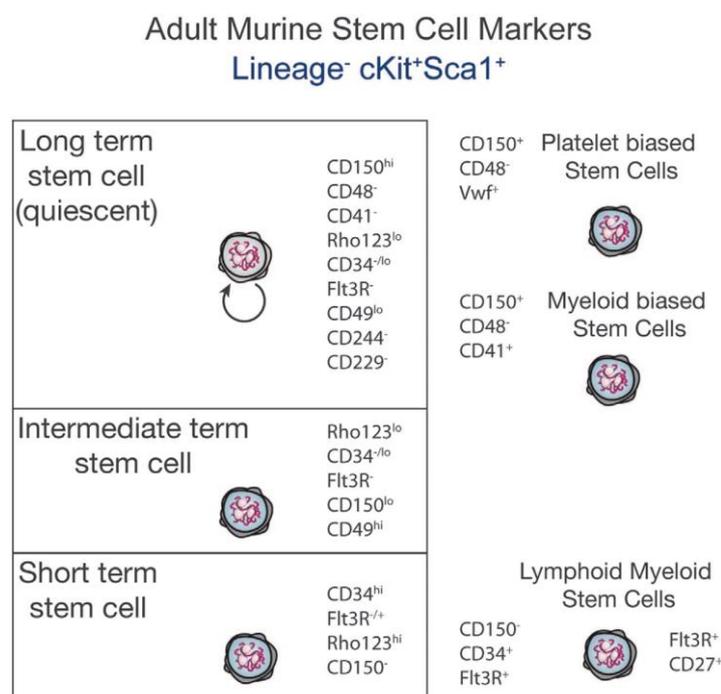


Figura 1.4. Alguns marcadores imunofenotípicos das células hematopoéticas imaturas de camundongos. À esquerda alguns marcadores encontrados nas células tronco hematopoéticas (CTH) do modelo convencional da hierarquia de diferenciação hematopoética. À direita alguns marcadores de populações de CTH recentemente descritas com expressão seletiva em algumas linhagens. Extraído de Ng e Alexander (2017).

Apesar de a teoria monofilética de diferenciação hierárquica das CTH ser a mais antiga e aceita, estudos recentes sugerem que as LT-HSC são heterogêneas e possuem diferentes cinéticas de reconstituição hematopoética em animais irradiados. De acordo com esse novo modelo, a teoria monofilética das CTH não reflete toda a complexidade do comprometimento das diferentes linhagens e sugere ainda que a especificação de determinadas linhagens pode ocorrer também diretamente a partir das LT-HSC, sem passar por uma longa hierarquia de diferenciação (Fig. 1.4) (Morita et al, 2010; Sanjuan-Pla et al, 2013; Woolthuis & Park, 2016). Entretanto, ainda não se sabe como a variedade das CTH se estabelece, se as diferenças são definidas no compartimento hematopoético antes mesmo da formação das CTH, ou se a heterogeneidade das CTH vai sendo adquirida ao longo do desenvolvimento do sistema hematopoético e persiste posteriormente na medula óssea (Morita et al, 2010).

É importante destacar que, embora o processo de hematopoese seja bastante conservado entre as espécies, as moléculas de superfície das CTH podem variar entre organismos de diferentes espécies e inclusive interespecie. Por exemplo, o Sca1, que é um marcador clássico em murinos, não é expresso em algumas linhagens de camundongos. E alguns marcadores bem definidos para as CTH em humanos não são expressos ou encontram-se em baixas quantidades em camundongos, como por exemplo o CD34 (Challen et al, 2009; Goodell et al, 1997; Mikkola, 2009).

1.2 Ontogenia do sistema hematopoético

A medula óssea começa a funcionar como órgão hematopoético apenas por volta da 11^a semana de gestação em fetos humanos, enquanto em camundongos essa atividade é observada somente próximo ao nascimento. Entretanto, o embrião em desenvolvimento necessita de células hematopoéticas para sobreviver e se desenvolver antes disso, e, nesse sentido, outros órgãos realizam hematopoese durante o período embrionário e fetal (Kim, 2010; Yamamoto et al, 2016). O desenvolvimento do sistema sanguíneo é um processo dinâmico e complexo, no qual a hierarquia hematopoética convencional observada durante a vida adulta aparece em sequência reversa e populações transitórias de progenitores e células

diferenciadas surgem antes da produção e estabelecimento das CTH. Células hematopoéticas são formadas em pelo menos três momentos distintos e em diferentes locais anatômicos. Além disso, as células formadas migram para diferentes sítios embrionários ao longo da gestação para completar o seu desenvolvimento, o que ocorre de forma sequencial de acordo com as mudanças anatômicas do embrião em organogênese. Cada local contribui de forma particular para a formação e/ou diferenciação das células hematopoéticas uma vez que os sinais do microambiente indutor são diferentes (Frame et al, 2013; Medvinsky et al, 2011; Mikkola & Orkin, 2006; Tavian et al, 2010). Apesar das diferenças peculiares de cada espécie, os sítios de hematopoese embrionária são conservados entre os órgãos equivalentes de zebrafish, anfíbios, aves, roedores e humanos (Ciau-Uitza et al, 2014).

É importante destacar ainda que, diferente das CTH adultas, as CTPH embrionárias são altamente proliferativas. Este fato somado com a natureza migratória destas células e a rapidez com que os fenômenos hematopoéticos ocorrem, torna a caracterização destas células e do seu nicho muito difíceis (Mikkola, 2009). Além disso, a maioria dos antígenos de superfície expressos pelas CTH são regulados ao longo do desenvolvimento e não são específicos de células formadas em um local anatômico específico. Sendo assim, ainda não existem ferramentas metodológicas robustas para separar ou marcar geneticamente células da progênie de cada sítio específico, uma vez que os precursores hematopoéticos se sobrepõe temporal e espacialmente (Lee et al, 2016). Nesse sentido, apesar de muitos avanços na identificação dos sítios embrionários com o surgimento de novas tecnologias e a descoberta de novos marcadores, a contribuição de cada um deles para a hematopoese fetal e adulta ainda tem muito para ser explorada (Kunisaki et al, 2013).

Em mamíferos, o mesoderma extraembrionário do saco vitelínico produz a primeira população transitória de eritroblastos que atende as necessidades imediatas do embrião em desenvolvimento (Lee et al, 2010). O saco vitelínico é uma membrana extraembrionária formada por uma camada externa de células do endoderma visceral e uma camada interna de células do mesoderma extraembrionário que envolve o embrião (McGrath & Palis, 2005; Palis & Yoder, 2001). Por volta de 18,5 dias na gestação humana, e aos 7,5 dias gestacionais (dg) em camundongos, são observados agregados homogêneos de células

mesodérmicas chamados de ilhotas sanguíneas. Nessas, as células periféricas irão se diferenciar em células endoteliais e as células internas em eritroblastos. Ilhotas sanguíneas adjacentes se unem formando a primeira rede vascular do saco vitelínico enquanto os eritrócitos em seu interior amadurecem de forma aparentemente sincrônica e são liberados no interior do vaso recém-formado aos 9,0 dg (Fig. 1.5) (Cumano & Godin, 2007; Golub & Cumano, 2013; Yumine et al, 2017). Essa sequência de eventos e similaridades morfológicas, bem como as coincidências do programa genético entre as células endoteliais e os eritrócitos nucleados sugerem que as duas linhagens tenham um precursor mesodérmico comum conhecido como hemangioblasto (Ciau-Uitza et al, 2014). Por exemplo, células clonogênicas VEGFR2⁺ isoladas de células tronco embrionárias, bem como células mesodérmicas Brachyury⁺ e VEGFR2⁺ isoladas da linha primitiva do embrião deram origem a ambas as linhagens *in vitro* (Ciau-Uitza et al, 2014; Huber et al, 2004). Por outro lado, experimentos de rastreamento de linhagens *in vivo* mostraram a presença de progenitores distintos assim como raros hemangioblastos (Ueno & Weissman, 2006).

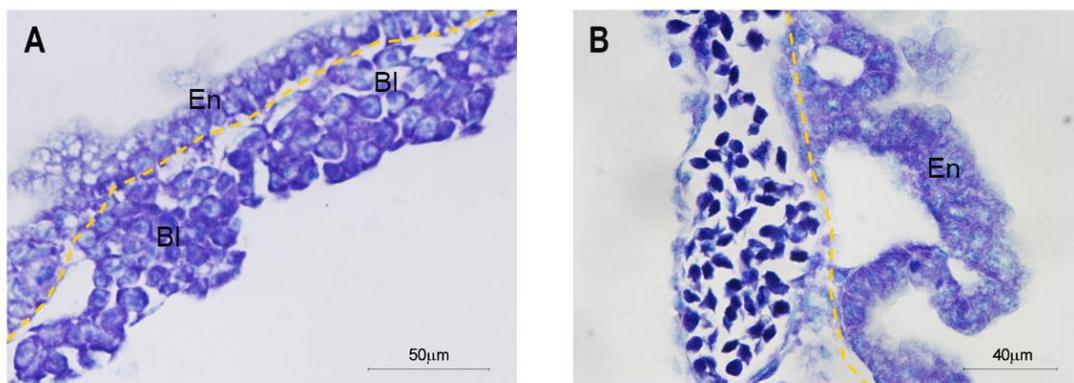


Figura 1.5. Eritropoese primitiva no saco vitelínico de camundongos. (A) Saco vitelínico aos 7,5 dg constituído de uma monocamada de endoderma (En) e células mesodérmicas formando ilhotas sanguíneas (BI). As células das ilhotas sanguíneas são conhecidas como hemangioblasto e são grandes e morfológicamente similares entre si. **(B)** Aos 11,5 dg, eritrócitos nucleados circulam nos vasos do saco vitelínico. Extraído de Portilho et al (2016).

Os eritrócitos produzidos nas ilhotas sanguíneas são chamados de “primitivos”, pois são células grandes e nucleadas e, portanto, diferentes das células da linhagem eritroide adulta de mamíferos, mas que se assemelham às células eritroides de vertebrados adultos mais inferiores como peixes, aves e anfíbios (Cumano & Godin, 2007; Gekas et al, 2010; Lee et al, 2010; Tavian et al, 2010). Estas células são cerca de 80% maiores do que os eritrócitos definitivos e, além disso, expressam hemoglobinas embrionárias e se diferenciam rapidamente na

progênie adulta (Fraser, 2013; Fraser et al, 2007). Os eritroblastos perdem a capacidade de formar colônias eritroides *in vitro*, alteram o metabolismo e deixam de expressar algumas moléculas de adesão (Fraser, 2013). Os eritrócitos primitivos são abundantes na circulação até 13,5 dg quando as células eritroides definitivas formadas no fígado fetal são frequentes. Os eritrócitos primitivos possuem capacidade proliferativa quando ingressam na circulação sanguínea, diminuindo o ritmo de divisões a partir de 11,5 dg. Ao longo desse período, as células passam por mudanças morfológicas que se assemelham à maturação eritroblástica convencional das células adultas: entre 9,5 e 12,5 dg o núcleo dos eritrócitos se condensa progressivamente e acumula hemoglobina deixando o citoplasma menos basofílico; as células perdem o nucléolo evidente aos 10,5 e, por fim, ocorre a enucleação no fígado fetal ou na placenta (Fraser et al, 2007; Handel et al, 2010; Isern et al, 2008; Vacaru et al, 2013). Elas também mudam a composição do citoesqueleto, por exemplo perdendo a expressão de vimentina, e também alteram os níveis de expressão de determinados marcadores de superfície, como a diminuição de CD71 e o aumento de Ter119 (Fraser, 2013). Também é observada uma alteração sequencial na expressão de hemoglobinas, com a diminuição da expressão gênica de hemoglobinas embrionárias e o aumento da expressão de algumas cadeias de hemoglobinas adultas (Fraser, 2013; Lee et al, 2016). Aos 15,5 dg, quase todos os eritrócitos primitivos são anucleados e podem persistir na corrente sanguínea em até três semanas após o nascimento (Fraser et al, 2007).

Os eritrócitos primitivos expressam uma série de moléculas de superfície comuns a outros progenitores hematopoéticos como c-Kit, VE-caderina, CD31 e a integrina CD41 (Isern et al, 2011; Robin et al, 2011). Entretanto, CD9 e o receptor de quimiocina CXCR7 (do inglês *C-X-C chemokine receptor type 7*) parecem ser expressos apenas nos eritrócitos primitivos e não nos eritrócitos definitivos (Berahovich et al, 2010; Fraser, 2013). A indução da hematopoese primitiva parece ser induzida por fatores secretados pelo endoderma adjacente do saco vitelínico, principalmente Indian Hedgehog (Ihh) e VEGF (do inglês *Vascular endothelial growth factor*) (Yumine et al, 2017). Quanto à regulação gênica no mesoderma, os fatores de transcrição Lmo2, SCL/Tal-1 e Gata2 são importantes para a diferenciação das ilhotas sanguíneas e parecem influenciar também a hematopoese definitiva. Por outro lado, alguns fatores de transcrição que influenciam a hematopoese definitiva parecem não ser tão importantes para a hematopoese primitiva, como Myb e Runx1,

enquanto outros fatores afetam apenas a maturação dos eritrócitos, mas não a sua formação, como Gata1 e Epo (Fraser, 2013; Isern et al, 2011). Níveis de oxigênio também parecem afetar diretamente os progenitores primitivos, os quais proliferam mais em condições de cultura com baixa concentração de oxigênio (Isern et al, 2011).

Na primeira onda hematopoética do saco vitelínico aos 7,5 dg, também são formados macrófagos e megacariócitos, embora ainda não se saiba qual é o progenitor destas células (McGrath & Palis, 2005). Os macrófagos primitivos e progenitores de megacariócitos formados nessa primeira onda hematopoética também apresentam peculiaridades em relação às células correspondentes definitivas. Os macrófagos parecem se diferenciar diretamente a partir de progenitores macrofágicos ao invés de monócitos. Além disso, possuem grande capacidade proliferativa e longevidade e um repertório diferente de enzimas, como a ausência de atividade peroxidase, por exemplo (Godin & Cumano, 2002). Acredita-se que estes macrófagos formem as ilhotas eritroides do fígado fetal e que persistam na vida adulta como células microgliais do sistema nervoso central. Já os progenitores megacariocíticos não possuem receptores para G-CSF, sofrem maturação mais rápida e com menos poliploidia comparado com os progenitores megacariocíticos adultos (Godin & Cumano, 2002). Apesar de pouco se saber sobre a função dos megacariócitos nesse período, é provável que eles contribuam para a formação de plaquetas, que são observadas mais tardiamente no feto de camundongos (por volta de 10,5 dg). Estes megacariócitos também foram relacionados à formação de vasos linfáticos (Frame et al, 2013; Godin & Cumano, 2002; Tober et al, 2007).

A segunda onda de produção de células hematopoéticas também acontece no saco vitelínico, onde são formados progenitores eritromieloides definitivos, pois se assemelham às células do organismo adulto (McGrath & Palis, 2005). Primeiro foram isolados progenitores eritroides definitivos BFU-E (do inglês *burst forming units-erythrocyte*) a partir de 8,5 dg no saco vitelínico, e que produziam apenas hemoglobinas adultas (McGrath & Palis, 2005). Mais tarde, outros progenitores mieloeritroides foram encontrados na circulação sanguínea e fígado fetal. *Clusters* de células c-Kit⁺ foram observados associados ao endotélio dos vasos vitelínicos neste período os quais não se formavam na ausência Runx1. Este trabalho e experimentos subsequentes vêm mostrando que o endotélio do saco vitelínico

possui plasticidade necessária para se diferenciar em células hematopoéticas definitivas, propriedade conhecida como endotélio hemogênico (Frame et al, 2013). Depois de formadas, as células mieloeritroides migram para o fígado fetal que possui o microambiente necessário para a expansão destas células. Apesar de serem consideradas definitivas, as células formadas nessa segunda onda hematopoética não possuem potencial de formar células linfoides e nem capacidade prolongada de autorrenovação. Sendo assim, estas células foram consideradas transitórias como as primeiras células hematopoéticas da primeira onda, não persistindo nos organismos adultos (Lee et al, 2016).

As LT-HSC pluripotentes que persistem na vida adulta são formadas na terceira e última onda de produção hematopoética, que acontece por volta de 10,5 dg em camundongos e entre os dias 27 e 40 do desenvolvimento humano (Tavian et al, 2010). Como as primeiras células hematopoéticas foram observadas no saco vitelínico, acreditou-se por muito tempo que todas as células hematopoéticas eram formadas nesse local, uma hipótese sustentada por experimentos da década de 1960 realizados em embriões de aves (Moore & Owen, 1967; Moore & Metcalf, 1970). Mais de uma década depois, foi demonstrado que as CTH na verdade são formadas no corpo embrionário de aves, em experimentos com quimeras codorna-galinha (Dieterlen-Lievre, 1975). A origem intraembrionária das CTH foi demonstrada também em outros modelos animais incluindo embriões de camundongos e humanos (Ciau-Uitza et al, 2014; Cumano et al, 1993; Ogawa et al, 1988). O primeiro sítio intraembrionário produtor de CTH identificado foi a parede ventral da aorta dorsal próxima das gônadas e dos mesonéfrons, conhecida como região AGM (Aorta-gonadas-mesonéfrons), a qual possui propriedades hematopoéticas em todos os vertebrados estudados até hoje (Ciau-Uitza et al, 2014; Godin & Cumano, 2002; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Müller et al, 1994).

A aorta dorsal se forma a partir da fusão de duas artérias pré-existentes em uma artéria dorsal única em resposta ao BMP secretado pela notocorda adjacente (Ciau-Uitza et al, 2014). O potencial hematopoético dessa região está presente antes mesmo da diferenciação da aorta, no tecido precursor conhecido como esplancnopleura para-aórtica. A origem das CTH na aorta era bastante debatida entre os pesquisadores, na qual uma corrente defendia que estas células eram formadas pelo mesoderma subendotelial e então migravam para o lúmen da aorta, enquanto a outra corrente defendia a diferenciação a partir de endotélio hemogênico

(Godin & Cumano, 2002; Zovein et al, 2008). Entretanto, experimentos com diferentes técnicas de microscopia da aorta de camundongos forneceram provas robustas da origem endotelial das CTH. Nestes, foi possível observar a diferenciação de células endoteliais inicialmente planas em células hematopoiéticas redondas no lúmen da aorta, em um processo conhecido como transição endotélio-hematopoética. Hoje sabe-se que esse fenômeno ocorre em toda extensão da aorta dorsal, não só na região de AGM, e também nas artérias umbilicais e vitelínicas (Boisset et al, 2010; Bos et al, 2015; Kauts et al, 2016; Swiers et al, 2013; Yokomizo & Dzierzak, 2010). Foram quantificadas aproximadamente 600 células c-Kit⁺ no interior da aorta de camundongos aos 10,5 dg, isoladas ou organizadas em *clusters* contendo até 19 células, com o número de células diminuindo após 11,5 dg. No mesmo experimento de *whole mount*, foram identificadas entre 250 e 300 células c-Kit⁺ nas artérias umbilicais e vitelínicas, as quais continham *clusters* maiores (Yokomizo & Dzierzak, 2010). Ao mesmo tempo, o monitoramento em tempo real da transição endotélio-hematopoética na AGM mostrou que os *clusters* de CTH são raros: em 12 experimentos independentes, em embriões com 10,5 dg foram observados uma média de 1,7 brotamentos por embrião, no qual cada evento tinha duração média de 1h15min (Boisset et al, 2010). *Clusters* intravasculares foram observados também nos vasos sanguíneos da região da cabeça fetal e na placenta durante o mesmo período embrionário, embora esses dois sítios não tenham sido muito explorados no contexto hematopoético (Li et al, 2012; Rhodes et al, 2008).

Apesar de serem as mesmas células que persistem na vida adulta, as CTH embrionárias e adultas podem expressar alguns marcadores de superfície de forma diferente. Por exemplo, as moléculas MAC1 e AA4.1 estão presentes apenas nas CTH embrionárias. É provável que tais diferenças decorram da intensa divisão celular que as CTH embrionárias apresentam, enquanto as CTH adultas ficam em estado predominantemente quiescente (Godin & Cumano, 2002). Ainda, as CTH recém-formadas precisam passar por um processo de maturação para adquirir as propriedades que as definem como LT-HSC em transplantes funcionais. Acredita-se que durante a maturação, as CTH adquirem moléculas de superfície necessárias para o *homing* e/ou modulam genes que lhes conferem capacidade de autorrenovação (Golub & Cumano, 2013; Mikkola & Orkin, 2006).

As células tronco e progenitores hematopoéticos definitivos, formados na segunda e na terceira onda hematopoética possuem moléculas de superfície em

comum e são influenciados pelos mesmos fatores de transcrição. A VE-caderina está presente em todo endotélio hemogênico e algumas CTH recém-formadas, assim como o CD31. Ao mesmo tempo, todas as células hematopoéticas imaturas expressam c-Kit e CD41 (Mikkola & Orkin, 2006). O CD41 (ou integrina αIIb) era inicialmente utilizado como um marcador da linhagem megacariocítica, mas experimentos mostraram que essa integrina também está presente nas células hematopoéticas mais imaturas das linhagens primitiva e definitiva (Mikkola et al, 2003). O CD41 é o primeiro marcador adquirido pelas CTPH durante a transição epitélio-hematopoética, e, portanto, ausente nas células endoteliais ou mesodérmicas e específico para as células hematopoéticas imaturas (Mikkola et al, 2003; Mikkola & Orkin, 2006; Robin et al, 2011). Diferente do c-Kit, a expressão de CD41 é regulada negativamente ao longo do desenvolvimento podendo ser identificadas LT-HSC na fração celular CD41⁺ ou negativa após 12,5 dg (Robin et al, 2011). Curiosamente, o CD41 volta a ser expresso em algumas CTH adultas, as quais possuem grande capacidade de reconstituição a longo prazo e uma tendência para se diferenciar em células da linhagem mieloide (Gekas & Graf, 2013). Outros marcadores são adquiridos pelas CTPH definitivas durante o processo de maturação, como por exemplo Sca1 e CD45 (McKinney-Freeman et al, 2009; Mikkola & Orkin, 2006).

Enquanto o comprometimento dos precursores mesodérmicos do saco vitelínico com a hematopoese primitiva é dependente do fator de transcrição SCL/Tal-1, a transição endotélio-hematopoética depende principalmente do fator de transcrição Runx1/AML (Fig. 1.6) (Ciau-Uitza et al, 2014; Mikkola & Orkin, 2006; North et al, 2002). Além do Runx1 ser essencial para a formação das CTPH definitivas, ele continua a ser expresso pelas CTH durante a vida adulta (North et al, 2002). Outros fatores de crescimento influenciam a hematopoese definitiva como por exemplo c-Myb e Gata2. Além de fatores de crescimento, o fluxo sanguíneo é importante para a formação das células definitivas. A importância da força de cisalhamento na formação de células hematopoéticas foi demonstrada em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Adamo & García-Cardena, 2012; Ciau-Uitza et al, 2014).

Depois de formadas, as CTPH definitivas livres na circulação sanguínea migram para o fígado fetal onde se expandem e se diferenciam. Apesar de não produzir as células hematopoéticas, o fígado fetal começa a receber estas células

por volta de 11,0 dg e proporciona o microambiente necessário para que ocorra a expansão e diferenciação (Ayres-Silva et al, 2011; Fraser, 2013; Sugiyama et al, 2011). Na eritropoese definitiva, presente no fígado fetal, são observadas células da linhagem eritroide em diferentes estágios de maturação em meio aos cordões hepatocitários imaturos (hematopoese trabecular), em organização que lembra a da medula óssea. Elas ficam ao redor de um macrófago central em uma organização conhecida como ilhotas eritroides. Além de fagocitar eritroblastos primitivos e restos nucleares, estes macrófagos parecem atuar na transferência bidirecional de ferro de/para os eritroblastos. Diferente da hematopoese primitiva, os eritrócitos expressam apenas hemoglobinas adultas e perdem o núcleo antes de entrar na circulação sanguínea (Fraser, 2013). Além de eritropoese, ocorre a diferenciação de outras células mieloides no fígado fetal, as quais são observadas próximas do tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos, sugerindo que nichos diferentes e especializados para diferentes linhagens compõem o fígado fetal (Ayres-Silva et al, 2011). De fato, ao menos no fígado, o desenvolvimento eritroide ocorre no estroma endodérmico, enquanto a mielopoese necessita de um estroma mesenquimal. A progênie formada no fígado fetal pode ser observada na circulação sanguínea por volta de 12,5 dg, aumentando em número até o final da gestação (Frame et al, 2013; Fraser, 2013; Swain et al, 2014).

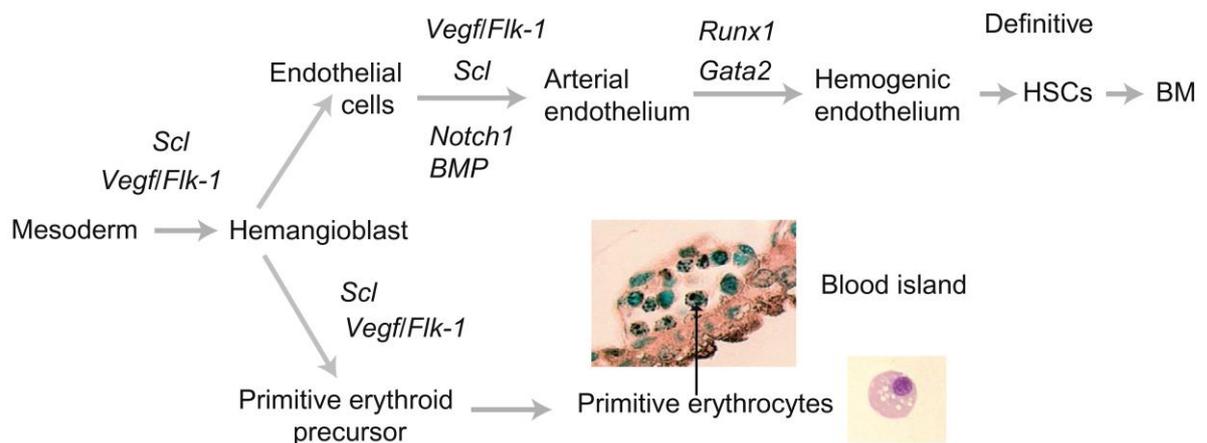


Figura 1.6. Desenvolvimento da hematopoese primitiva e definitiva. O mesoderma da placa lateral forma os hemangioblastos Flk⁺ que se diferenciam nas linhagens eritroides primitivas e em células endoteliais com potencial hemogênico (*hemogenic endothelium*). O início da hematopoese é caracterizado pela formação de eritrócitos primitivos nas ilhotas sanguíneas do saco vitelínico (*Primitive erythrocytes; blood island*) mediante sinalização Vegf/Flk1. As Células tronco hematopoéticas (HSC) que formam as linhagens mieloides e linfoides definitivas (*definitive*) se diferenciam a partir da transição endotelial-hematopoética influenciadas pela sinalização de Runx1. Extraído de Hoang et al (2016).

O nicho hepático compreende os hepatoblastos, células estromais e endoteliais. Os hepatoblastos e células estromais produzem diversos fatores de crescimento e citocinas que estimulam a diferenciação e proliferação, mantendo a capacidade de autorrenovação das CTPH, como por exemplo EPO, SCF e CXCL12. Alguns genes são regulados positivamente nas CTH do fígado fetal, como por exemplo o PU.1. Este fator de crescimento está envolvido tanto na manutenção da autorrenovação das CTH no fígado fetal quanto para a diferenciação de determinadas linhagens mieloides (Kim et al, 2004). A hematopoese no fígado fetal é observada até aproximadamente 15,0 dg, quando ocorre o amadurecimento dos hepatócitos, preparando o fígado para sua função pós-natal (Swain et al, 2014).

Enquanto o fígado é um importante órgão hematopoético durante a vida embrionária em mamíferos, ele não parece participar tão ativamente da hematopoese em aves. O estudo morfológico de embriões de galinha mostrou apenas atividade granulopoética no fígado a qual ocorre em períodos mais tardios. Neste animais, o saco vitelínico parece ser o principal local para expansão e diferenciação das linhagens eritrocíticas e granulocíticas (Guedes et al, 2014). Porém, assim como ocorre no fígado, o desenvolvimento eritroide ocorre no estroma endodérmico do saco vitelínico, enquanto a mielopoese ocorre no estroma mesenquimal (Guedes et al, 2014; Sugiyama et al, 2011). É provável que a involução do saco vitelínico em mamíferos favoreceu adaptações filogenéticas que compensam essa perda, como a criação de um ambiente hepático para expansão hematopoética, por exemplo (Guedes et al, 2014).

A saída de precursores hematopoéticos do fígado de camundongos coincide com o processo de ossificação. Células tronco hematopoéticas e mesenquimais chegam na medula óssea em formação através dos vasos sanguíneos do perióstio e persistem na vida adulta (Ayres-Silva et al, 2011; Kinoshita & Miyajima, 2002). A atividade hematopoética no fígado fetal cessa após o nascimento, embora alguns autores acreditem que ele mantém algumas CTH e realiza eritropoese e mielopoese em baixos níveis (Kim, 2010). A dinâmica temporal de constituição de sítios hematopoéticos em camundongos está representada esquematicamente na figura 1.7.

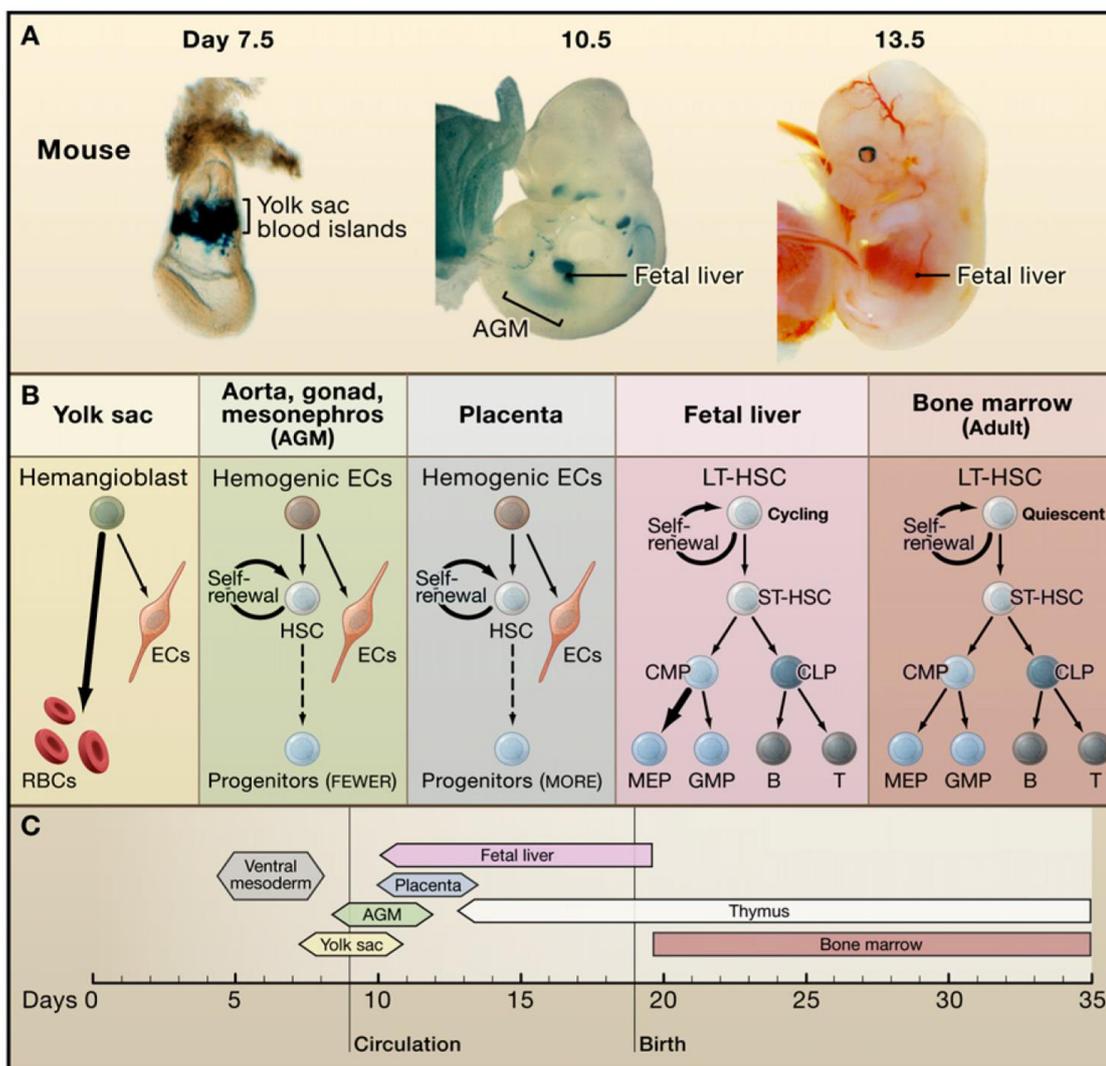


Figura 1.7. Ontogenia do sistema hematopoético de camundongo: constituição e regulação das células hematopoéticas nos diferentes sítios. (A) O saco vitelínico (*yolk sac*) é o primeiro local de hematopoese seguido da região de aorta dorsal, aqui representada pela região da AGM, a placenta e o fígado fetal. Coloração de LacZ permite a visualização das ilhotas sanguíneas (*blood islands*) no saco vitelínico de camundongos *knock-in Gata1-LacZ* enquanto a AGM e fígado fetal (FL) são visualizadas pela mesma coloração feita em camundongos *knock-in Runx1-LacZ*. (B) Cada sítio hematopoético favorece a formação de linhagens específicas, possuindo diferentes funções na constituição do sistema sanguíneo. ECs: células endoteliais; RBCs: eritrócitos; LT-HSC; ST-HSC; CMP; CLP; MEP: progenitores megacariocítico e eritroide; GMP: progenitores granulocítico e macrófago. (C) Janela de desenvolvimento hematopoético em cada sítio embrionário e adulto. Extraído de Orkin e Zon (2008).

Em camundongos, o baço também representa um órgão hematopoético importante, não só durante a ontogenia, mas também na vida adulta. Tendo início por volta de 13 dg, o baço, que é um órgão essencialmente mesodérmico, realiza principalmente eritropoese. Apesar disso, já foram detectados precursores das linhagens neutrofílica, megacariocítica e macrófaga, bem como linfocitária no baço no final da vida fetal (Cumano & Godin, 2007; Golub & Cumano, 2013). Em humanos, o baço também é apontado como órgão hematopoético por volta do

segundo trimestre de gestação, embora de forma menos representativa que em camundongos. Na vida adulta, o baço em humanos somente contribui com a eritropoese em condições de estresse (Yamamoto et al, 2016).

A hematopoese embrionária é um processo complexo regulado por múltiplos fatores (Golub & Cumano, 2013). Além disso, o conhecimento sobre a ontogenia do sistema hematopoético está sempre em evolução à medida em que novas metodologias surgem. Nesse sentido, novas tecnologias de manipulação genética e de mapeamento do destino da progênie celular têm ajudado a revelar informações acerca da contribuição dos precursores embrionários formados em cada onda hematopoética. A mais recente delas, e que representou uma quebra de paradigma, foi a descoberta de que os macrófagos formados a partir de progenitores mieloeritroides da segunda onda hematopoética não são transitórios como se pensava originalmente e persistem durante a vida adulta (Ginhoux & Williams, 2016; Yona et al, 2013). Por muitos anos prevaleceu a teoria de que os macrófagos residentes, ou seja, aqueles que residem nos tecidos e que são importantes para a homeostase local, se diferenciavam a partir de monócitos circulantes oriundos da medula óssea (Furth et al, 1972). Essa hierarquia celular conhecida como “Sistema mononuclear-fagocitário” parece de fato ocorrer em alguns tecidos. Mas hoje em dia sabe-se que muitos macrófagos residentes têm origem de precursores embrionários formados no saco vitelínico na segunda onda hematopoética. Depois de se diferenciar, eles migram para os tecidos antes do nascimento onde se estabelecem durante a vida adulta independente de precursores da medula óssea (Ginhoux & Williams, 2016). Experimentos de parabiose entre camundongos revelaram a presença de populações mistas de monócitos na circulação, assim como macrófagos residentes do sistema digestório, derme e coração, sugerindo a contribuição de monócitos circulantes na diferenciação destes macrófagos. Ao mesmo tempo, macrófagos residentes da pele (células de Langerhans), da micróglia e dos alvéolos pulmonares não se misturavam, sugerindo uma origem monócitos-independente (Yona et al, 2013). O mapeamento condicional de monócitos e macrófagos confirmou essa hipótese, mostrando que muitos macrófagos residentes, incluindo os alveolares e esplênicos, células de Kupffer e a microglia, são especificados antes do nascimento e se mantêm nos tecidos independente do suprimento de monócitos sanguíneos (Yona et al, 2013).

1.3 Hematopoese na placenta

1.3.1 A placenta

A placenta é um órgão transitório que se forma durante a gestação da maioria dos mamíferos e cujas funções são essenciais para uma gestação saudável, tanto para a mãe quanto para o feto em desenvolvimento. Além de promover a troca de gases e nutrientes entre as circulações materna e fetal, células especializadas da placenta produzem uma série de hormônios e fatores de crescimento que conferem proteção imunológica ao conceito e regulam a fisiologia da mãe e do feto ao longo da gestação e durante o parto (Simmons et al, 2007). Problemas na formação da placenta podem causar complicações gestacionais que resultam em morbidades e até mortalidade do feto ou da mãe, como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal (Cross, 2005; Rossant & Cross, 2001; Watson & Cross, 2005). A placenta possui uma estrutura bastante complexa formada por tecido materno e diversos tipos de células trofoblásticas derivadas do zigoto. As células trofoblásticas são células epiteliais especializadas para diversas funções durante a gestação (Simmons et al, 2007). A placenta de camundongos e humanos é do tipo hemocorial, na qual o sangue materno fica em contato com células trofoblásticas de origem fetal (Fig. 1.8). Apesar das diferenças na estrutura da membrana placentária em ambas as espécies, as células que compõem a membrana hemocorial e aquelas que invadem o tecido materno compartilham marcadores de superfície e vias de sinalização em comum e diversas analogias podem ser feitas (Georgiades et al, 2002; Soncin et al, 2015). Nesse sentido, camundongos vêm sendo bastante utilizados para estudar aspectos da formação e função placentária, principalmente no que diz respeito à função de determinados genes nesse processo.

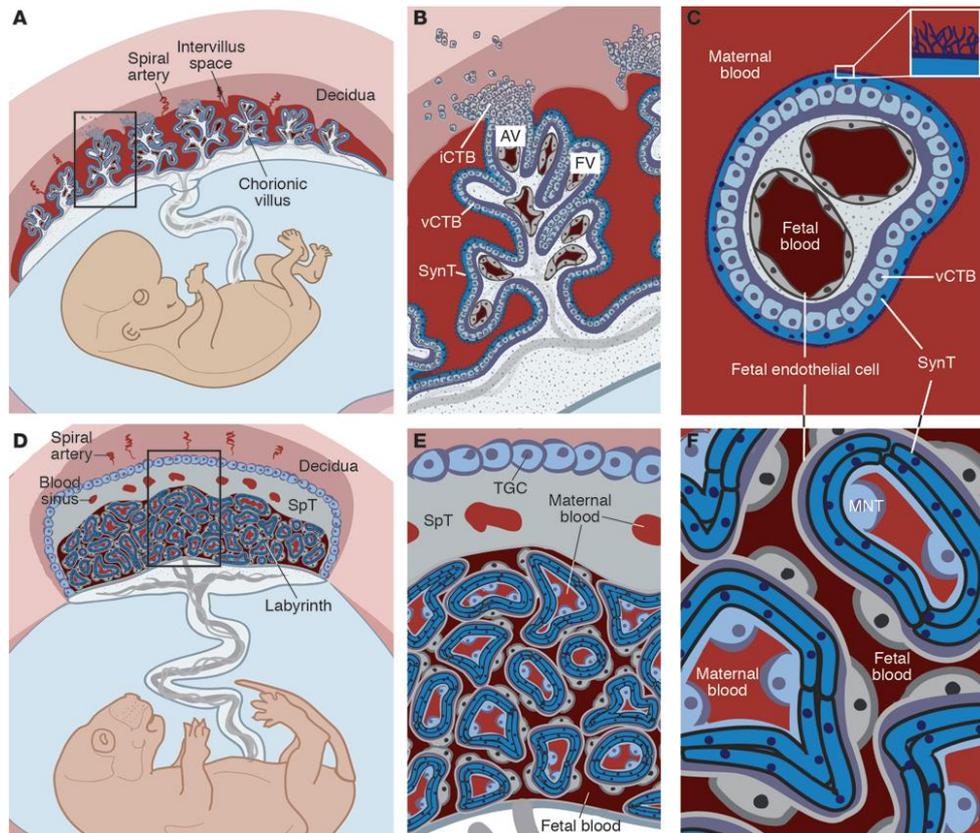


Figura 1.8. Anatomia comparada da placenta hemocorial humana (A-C) e de camundongos (D-F). Na placenta hemocorial o sangue materno fica em contato com células trofoblásticas coriônicas do feto. **(A)** Células trofoblásticas invadem as artérias espiraladas maternas levando à perfusão dos espaços intervilosos. **(B)** Na vilosidade coriônica (FV) células citotrofoblástica vilosas (vCTB) produzem uma camada multinucleada de sinciciotrofoblasto (SynT) que fica em contato com o sangue materno. As células citotrofobásticas que ficam na extremidade das vilosidades e em contato com a parede uterina se diferenciam em células trofoblásticas extravilosas invasivas (iCTB) que invadem a decidua. **(C)** O corte transversal da vilosidade coriônica mostrando a composição da membrana placentária: SyncT em contato com o sangue materno contém microvilosidades, seguida de vCTB, mesênquima e vaso fetal envolvido por endotélio. **(D)** Em camundongos, o sangue materno flui em espaços de sangue na camada espongiotrofoblástica (SpT) para chegar no labirinto. **(E)** Células trofoblásticas gigantes (TGC) de camundongos são análogas às iCTB da placenta humana. **(F)** Na membrana placentária de camundongos o sangue materno fica em contato com uma camada de células trofoblásticas mononucleares (MNTs), seguido de duas camadas de SyncT as quais estão em contato com células endoteliais dos vasos sanguíneos fetais. Extraído de Maltepe et al (2010).

1.3.2 Formação da placenta em camundongos

A placenta de camundongos contém três regiões principais: a decidua, a zona de junção e o labirinto (Fig. 1.8-D). A decidua é composta por células e vasos sanguíneos maternos que, na metade da gestação, contém também células trofoblásticas gigantes e células trofoblásticas glicogênicas derivadas do zigoto. Estas células são análogas ao trofoblasto extraviloso da placenta humana cujas propriedades invasivas e endócrinas são essenciais para a implantação e adaptação materna à gestação (Adamson et al, 2002; Simmons et al, 2007). A zona de junção contém uma camada de células trofoblásticas gigantes e células

espongiotrofoblásticas. Essa região é análoga à placa basal em humanos (Georgiades et al, 2002). Já o labirinto possui esse nome por ser formado por uma rede intrincada de espaços de sangue materno e vasos sanguíneos fetais. Entre as duas circulações, a membrana placentária é formada por células trofoblásticas gigantes em contato com o sangue materno, seguida de duas camadas multinucleadas de sinciciotrofoblasto e células endoteliais dos vasos sanguíneos fetais derivadas da alantoide (Fig. 1.8-E, F) (Maltepe et al, 2010; Simmons et al, 2008a). A placenta humana também é do tipo vilosa, porém com mais espaços entres as vilosidades. Ainda, a membrana placentária humana contém essencialmente sinciciotrofoblasto em contato com o sangue materno, uma camada de citotrofoblasto vestigial e mesênquima abundante (Fig. 1.8-B, C) (Georgiades et al, 2002; Maltepe et al, 2010; Rai & Cross, 2014).

A placentação em camundongos tem início com a implantação do embrião na parede uterina. Após a fertilização, o zigoto totipotente sofre uma série de divisões celulares nas quais as células passam por eventos de reprogramação e programação gênica que culminam na diferenciação das duas primeiras linhagens do blastocisto aos 3,5 dg: uma camada externa de células trofodérmicas e células da massa celular interna (Fig. 1.9) (Gasperowicz & Natale, 2011; Hemberger & Dean, 2014). O trofodermis consiste em um epitélio de transporte, no qual as células possuem polaridade, junções intercelulares e realizam o transporte de íons. Células do trofodermis darão origem a todas as células trofoblásticas da placenta, sendo chamadas de células tronco trofoblásticas. Já a massa celular interna sofre uma segunda diferenciação aos 4,5 dg, formando o endoderma primitivo e o epiblasto, sendo esse último conhecido como células tronco embrionárias (Fig. 1.9) (Gasperowicz & Natale, 2011; Gilbert, 2003; Hemberger & Dean, 2014).

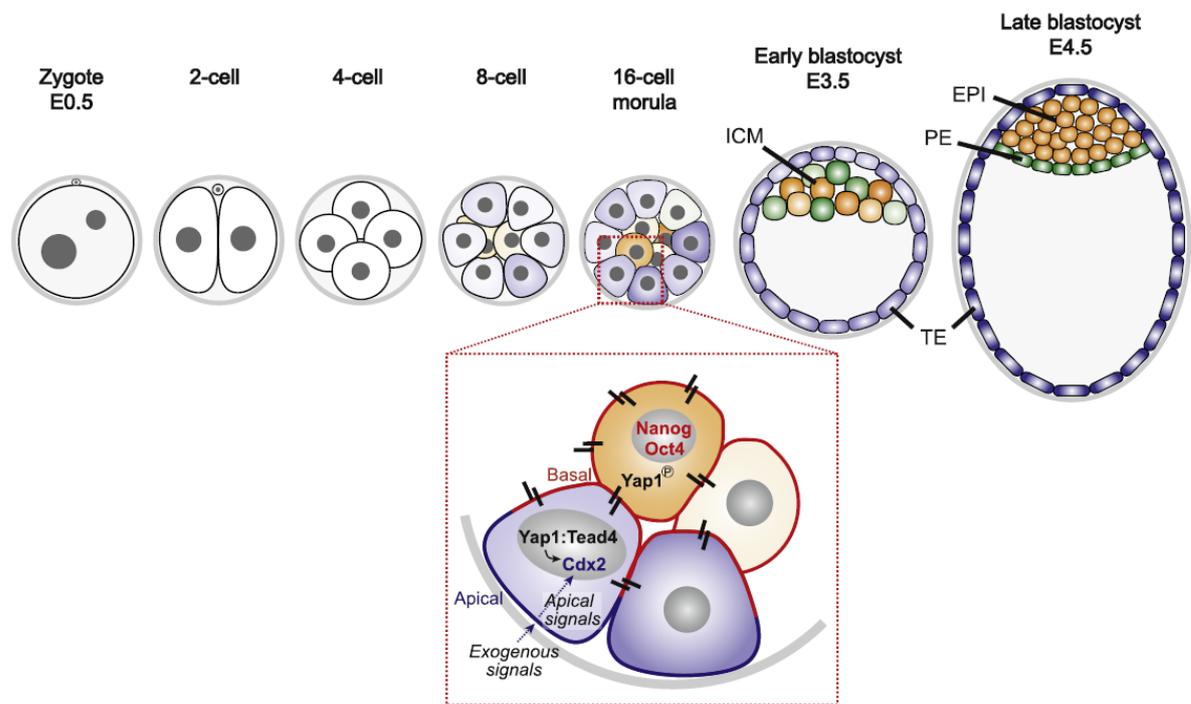


Figura 1.9. Do zigoto à formação do blastocisto. Processo de compactação para a formação do trofotoderma (TE) e da massa celular interna do blastocisto (ICM). A massa celular interna se diferencia em epiblasto (Chao et al) e endoderma primitivo (PE). Alguns fatores de transcrição importantes para o processo de compactação e diferenciação das células internas/ externas estão representados no quadrado da figura. Extraído de Hemberger e Dean (2014).

A especificação em trofotoderma ou massa celular interna ocorre devido ao processo de compactação das células associado aos diferentes padrões de expressão gênica entre elas. Dos fatores de transcrição importantes nessa segregação das células internas, o Oct4 e Nanog são expressos essencialmente pelas células da massa celular interna. Ao mesmo tempo, o Cdx2 e o Eomes são essenciais para a diferenciação do trofotoderma, e sua expressão fica restrita a essas células no estágio de blastocisto tardio (Fig 1.9) (2014; Hemberger & Dean, 2014; Russ et al, 2000; Soncin et al, 2015). Um dos alvos do Cdx2 é o Elf5, um fator de crescimento que aparece na fase de blastocisto tardio e que é importante para o comprometimento estável da linhagem trofotodérmica ao manter a expressão de Cdx2 e Eomes por *feedback* positivo. Na massa celular interna/ epiblasto o gene de Elf5 é silenciado permanentemente por metilação (Gasperowicz & Natale, 2011; Hemberger & Dean, 2014).

Em conjunto, a diferenciação do trofotoderma/trofoblasto segue uma hierarquia de ativação de genes, com ativação sequencial de *Cdx2*, *Eomes* e *Elf5*, entre outros. As células tronco trofoblásticas de características similares àquelas encontradas no estágio de blastocisto podem ser isoladas do conceito até

aproximadamente 8,0 dg. Após esse período, acredita-se que as células tronco ou progenitoras encontradas possuem um certo comprometimento com determinadas sublinhagens (Hemberger & Dean, 2014; Simmons, 2014; Uy et al, 2002).

O processo de implantação começa por volta de 4,5 dg quando o blastocisto chega na cavidade uterina e eclode da zona pelúcida. O blastocisto se liga à porção antimesometrial do útero através do polo abembrionário, ou seja, pela região oposta à massa celular interna. Com isso, o trofotoderma dessa região conhecido como trofotoderma mural para de proliferar mas continua a endorreplicar o DNA e a aumentar o volume, formando as células trofoblásticas gigantes (CTG) primárias. Estas CTG primárias possuem propriedades invasivas e fagocíticas para a implantação e também produzem hormônios e citocinas importantes para as adaptações fisiológicas da mãe durante a gestação, como a regulação do fluxo sanguíneo no sítio implantacional, produção de progesterona no ovário, lactogênese e hiperplasia das ilhotas pancreáticas (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Cross et al, 2002; Rossant & Cross, 2001; Watson & Cross, 2005). Ao mesmo tempo, o endométrio uterino sofre uma série de modificações, conhecidas como decidualização, as quais incluem diferenciação dos fibroblastos em células deciduais, infiltração de leucócitos e remodelamento dos vasos sanguíneos maternos. As modificações na decídua antimesometrial vão se estendendo lateralmente até chegar na decídua mesometrial aos 6,5 dg, a qual é conhecida como decídua basal e é onde a placenta hemocorial se estabelece (Adamson et al, 2002; Redhead et al, 2016).

Enquanto isso, o trofotoderma polar que está em contato com os tecidos embrionários continua em intensa proliferação formando o ectoderma extraembrionário. Primeiro, o ectoderma extraembrionário cresce em direção ao interior do blastocisto empurrando o epiblasto. Ele também cresce em direção à decídua mesometrial onde forma o cone ectoplacentário. As células tronco trofoblásticas do ectoderma coriônico são mantidas em estado proliferativo e indiferenciado através da expressão dos fatores de transcrição *Cdx2*, *Eomes* e *Esrrb*, os quais são influenciados pela sinalização dos fatores de crescimento *FGF4*, *TGFβ*, *activina* e *nodal* (Cross et al, 2003; Gasperowicz & Natale, 2011; Simmons et al, 2007; Soncin et al, 2015). Ao longo do desenvolvimento, o ectoderma coriônico irá formar as células trofoblásticas do córion, que por sua vez formam o labirinto da placenta, enquanto o cone ectoplacentário contém progenitores de diferentes

subtipos de CTG, espongiotrofoblasto e células glicogênicas (Rai & Cross, 2014; Watson & Cross, 2005).

1.3.2.1 Morfogênese do córion e do labirinto

Durante a gastrulação, por volta de 7,0 dg, o ectoderma coriônico emite uma dobra que se funde com a área oposta, delimitando duas cavidades: a cavidade ectoplacentária e a cavidade coriônica ou exoceloma. Uma terceira cavidade, a cavidade amniótica, permanece em contato com o epiblasto/ectoderma embrionário (Fig. 1.10). O mesoderma extraembrionário cresce em direção à cavidade coriônica delimitando internamente essa cavidade. A associação entre o mesoderma e o epiblasto/ectoderma embrionário forma o amnion enquanto a associação desse mesoderma com o ectoderma extraembrionário forma o córion. A região que contém essas duas camadas chama-se placa coriônica, de onde partem as vilosidades que formam o labirinto (Bevilacqua et al, 2014a; Simmons, 2014). A porção vascular da placenta é formada pelo mesoderma extraembrionário da alantoide que cresce a partir da região posterior do embrião em direção à cavidade coriônica aos 8,0 dg (Simmons et al, 2008a). A alantoide é formada por uma camada externa de epitélio mesodérmico conhecida como mesotélio, a qual expressa VCAM1, uma molécula importante para a ligação com o mesotélio do córion. A ligação corioalantoica acontece aos 8,5 dg quando a molécula de adesão VCAM1 reconhece a cadeia $\alpha 4$ de integrinas (Itga4; ligante de VCAM1 quando na integrina $\alpha 4\beta 1$), que é expressa no mesotélio coriônico (Cross et al, 2003; Watson & Cross, 2005).

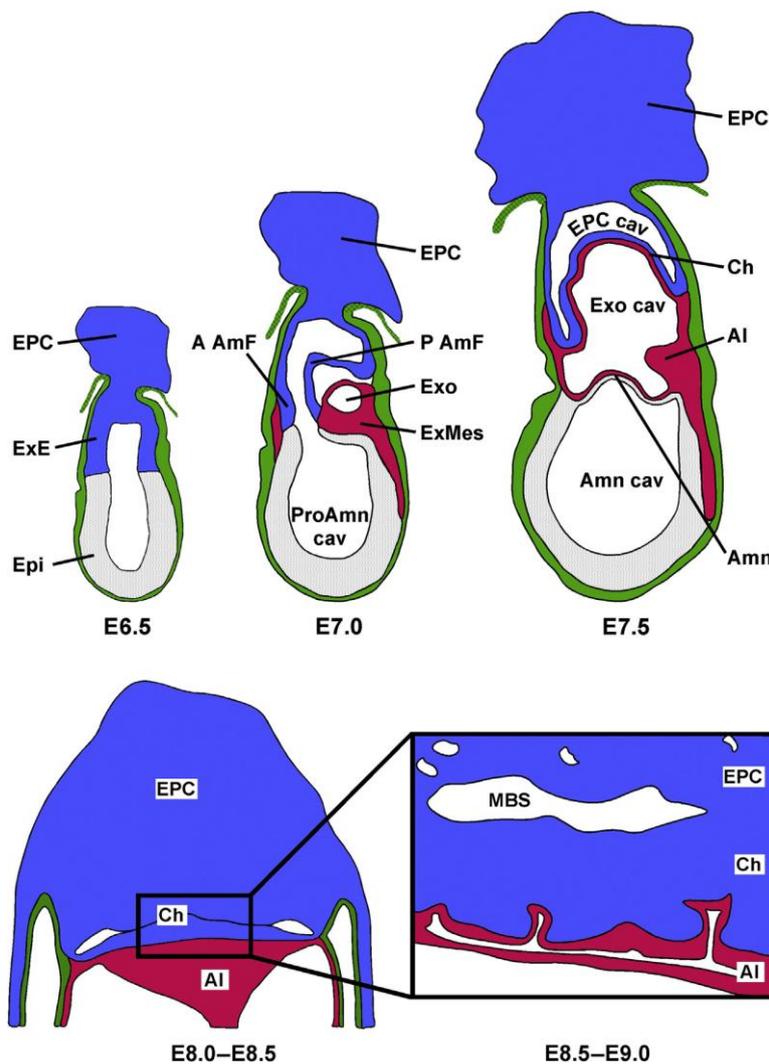


Figura 1.10. Morfogênese do córion e do labirinto. O ectoderma coriônico extraembrionário (ExE) seguido do mesoderma extraembrionário (ExMes) emite uma dobra que resulta na formação de três cavidades: cavidade ectoplacentária (EPC cav), exoceloma (Exo cav) e cavidade amniótica (Amn cav). O mesoderma e o ExE formam o córion (Ch). Ao mesmo tempo, o mesoderma da alantoide (Al) cresce e se une ao córion. Aos 8,5 dg a EPC cav é fechada e o mesoderma da alantoide está completamente espalhado na superfície do córion. Nesse momento, o córion começa a constituir dobras que são preenchidas pelo mesoderma da alantoide. Esse é o início da morfogênese das vilosidades coriônicas que culminam com a formação da membrana placentária hemocorial. EPC: cone ectoplacentário (EPC). Extraído de Simmons (2014).

Logo após a ligação corioalantoica, aos 9,0 dg, o córion começa a invaginar, criando espaços que serão preenchidos por vasos sanguíneos que crescem da alantoide através da vasculogênese *de novo* (Cross et al, 2006; Downs et al, 2001). Em camundongos, a região da placenta que contém as vilosidades é denominada labirinto. A diferenciação do labirinto envolve a diminuição da expressão dos genes *Cdx2*, *Eomes*, *Esrrb*, *Errb* e *Fgfr2* e o aumento da expressão de *Ascl2*, *Gcm1*, *Tpbpa* e *Prl8a2* (Bevilacqua et al, 2014a; Cross et al, 2006; Simmons et al, 2007). No momento da ligação corioalantoica, o córion é uma estrutura formada por células de diferentes origens. Enquanto a camada do mesotélio coriônico parece desaparecer após a ligação com a alantoide (Downs, 2002), acredita-se que o córion contenha células trofoblásticas originadas tanto do ectoderma coriônico quanto do cone ectoplacentário. Estas duas estruturas se unem por volta de 8,0 dg, após a obliteração da cavidade ectoplacentária devido à proliferação do ectoderma

extraembrionário. Estudos de morfologia ultraestrutural sugerem que a camada basal do córion seja derivada do ectoderma extraembrionário, enquanto as camadas mais externas seriam derivadas do cone ectoplacentário (Simmons, 2014; Watson & Cross, 2005).

O fator de transcrição Gcm1 é essencial para a formação das vilosidades. Ele é expresso em alguns *clusters* de células espalhados na placa coriônica, enquanto as outras células do córion continuam expressando genes de progenitores multipotentes como *Cdx2*, *Eomes* e *Rhox4* (*sin.* Ehox) (Fig. 1.11). Após a ligação com a alantoide, o córion começa a invaginar nos locais contendo as células Gcm1⁺ e o espaço criado é preenchido pelo mesoderma da alantoide contendo vasos fetais revestidos por células endoteliais (Cross et al, 2006; Soncin et al, 2015). A expressão de Gcm1 também estimula a produção do gene *Synb* que promove a fusão entre as células Gcm1⁺ para formar a camada II de sinciciotrofoblasto (sinc-II) (Soncin et al, 2015). A expressão de Gcm1 é observada na porção distal da vilosidade durante todo período que em que elas estão crescendo e se ramificando (Anson-Cartwright et al, 2000). Com o crescimento, as células do sinc-II atingem a porção mais distal do córion aonde fazem contato com células que expressam *Syna*. A proximidade entre essas células provavelmente estimula a fusão das células *syna*⁺ para formarem o sinciciotrofoblasto I (sinc-I). Externamente a essas duas camadas de sincício, encontram-se células trofoblásticas gigantes que na face oposta ficam em contato com espaços sinusoides de sangue materno. Ainda não se sabe o mecanismo de diferenciação destas células, apenas que elas são originadas de um precursor *Tpbpa*⁻ e que produzem prolactina *Prl3b1* (Pl2) e *cathepsin Q* (Ctsq) em fases tardias do desenvolvimento (Cross, 2005; Hu & Cross, 2011; Rai & Cross, 2014; Simmons, 2014; Simmons et al, 2007; Soncin et al, 2015).

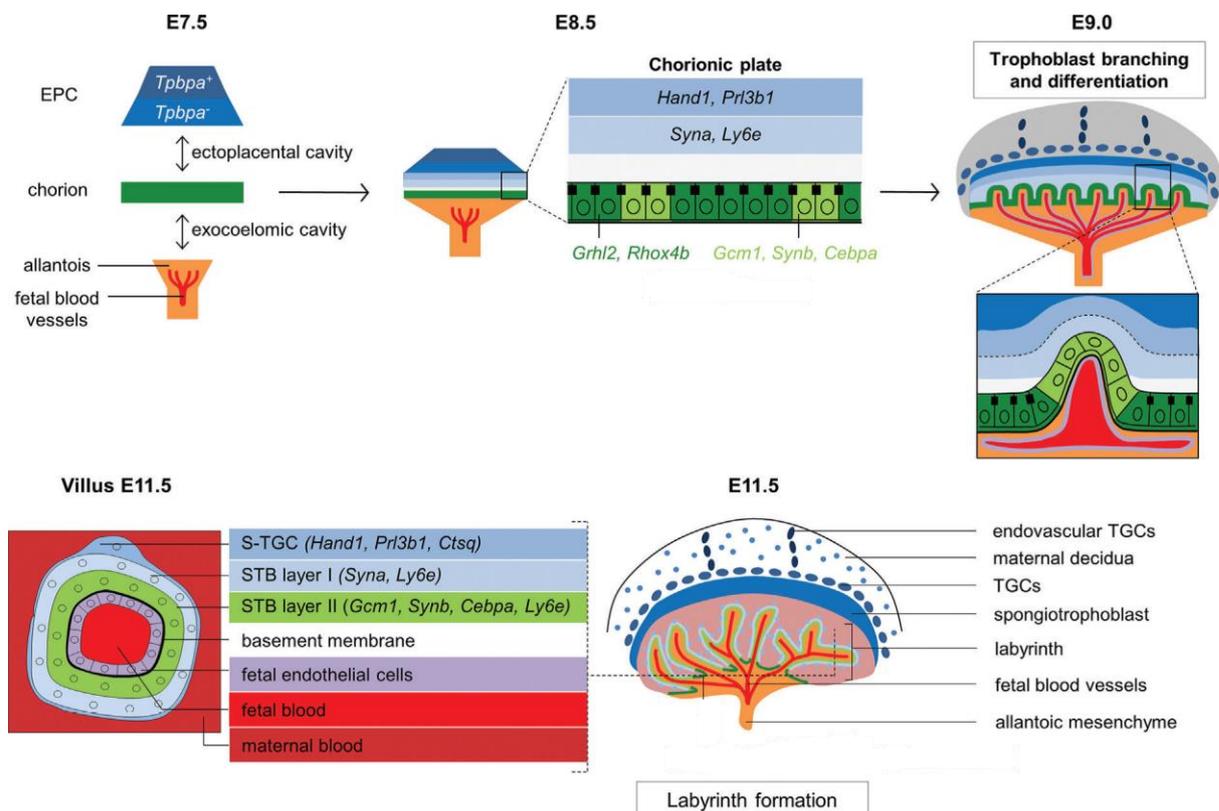


Figura 1.11. Morfogênese do labirinto. Aos 8,5 dg ocorre a fusão das cavidades ectoplacentária (*ectoplacental cavity*) e exocelômica (*exocoelomic*) e os diferentes tecidos que formam a placenta ficam em contato. Alguns genes expressos pelas células da placa coriônica guiam a morfogênese e continuam sendo expressos pelas células da membrana placentária. Adaptado de Walentin et al (2016).

Aos 9,5 dg é possível identificar a membrana placentária embora a placenta estruturalmente madura é estabelecida aos 10,5 dg (Fig. 1.11). Essa membrana vai diminuindo a espessura ao longo da gestação o que facilita as trocas entre as circulações materna e fetal. Os vasos sanguíneos fetais também continuam se ramificando e, conseqüentemente, aumentando a eficiência de troca, embora a organização anatômica do labirinto não modifique muito. Acredita-se que raros progenitores trofoblásticos persistam no labirinto na segunda metade da gestação de camundongos, embora estes progenitores estejam apenas começando a ser caracterizados (Simmons, 2014). Células que expressam *Ly6e* foram identificadas como precursores de células *Syna*⁺ que formam a camada de Sinc-I, sendo identificados no córion desde 8,5 dg (Hughesa et al, 2014). Também foram identificadas célula *EpCAM*^{hi}, entre 9,5 e 14,5 dg, que foram capazes de se diferenciar em Sinc-I, Sinc-II e CTG-S *in vitro* (Ueno et al, 2013).

1.3.2.2 Desenvolvimento do cone ectoplacentário

O cone ectoplacentário é formado por uma mistura de progenitores que se diferenciam em CTG, espongiotrofoblasto e células trofoblásticas glicogênicas. O estado relativamente indiferenciado dos progenitores do cone ectoplacentário é mantido pela expressão de *Ascl2* (*sin. Mash2*), o qual é expresso inicialmente no córion e cone ectoplacentário e depois no espongiotrofoblasto (Bevilacqua et al, 2014a; Simmons, 2014). As células mais indiferenciadas e com alto índice proliferativo são chamadas de trofoblasto intermediário e ficam na porção mais interna do cone ectoplacentário. À medida que estas células se afastam dessa região em direção à periferia, elas começam a se diferenciar em células trofoblásticas gigantes, as quais são chamadas de CTG secundárias para distinguir das CTG primárias formadas pelo trofocotoderma mural (Bevilacqua et al, 2014a). A diferenciação em CTG envolve a diminuição da expressão de *Ascl2* e aumento da expressão de fatores como *Hand1* e *Stra1* (Cross, 2005; Simmons & Cross, 2005).

O cone ectoplacentário também contém precursores das células espongiotrofoblásticas e células glicogênicas da zona de junção. Tanto as células espongiotrofoblásticas quanto células do cone ectoplacentário expressam os genes *Tpbpa* e *VEGFR1*, o que sugere uma origem comum entre as duas células (Cross et al, 2003; Guillemot et al, 1994). O *Tpbpa* (do inglês *Trophoblast specific protein alpha*) é um dos raros genes expressos exclusivamente na placenta de camundongos embora suas funções sejam desconhecidas (Rawn & Cross, 2008). Ele é expresso inicialmente em algumas células da região apical do cone ectoplacentário aos 7,5 dg e mais tarde, está presente em todas as células espongiotrofoblásticas indiferenciadas e diferenciadas, em diferentes níveis de expressão (Cross et al, 2003; Lescisin et al, 1988; Rawn & Cross, 2008). As células glicogênicas são detectadas na camada espongiotrofoblástica a partir de 12,5 dg e, então, aumentam em número, invadindo a decídua (Simmons, 2014). Não se sabe a origem exata das células glicogênicas, mas uma vez que elas expressam *Tpbpa* e surgem primeiro na camada espongiotrofoblástica antes de migrar para a decídua, acredita-se que sejam formadas por progenitores espongiotrofoblásticos (Adamson et al, 2002). Entretanto, estudos recentes identificaram alguns genes expressos exclusivamente nas células glicogênicas como *Pcdh12*, *Aldh1a3*, *Cx31* (*sin. Gib3*), *Prln* (*sin. Prl7b1*) e *Prdm1*, e em algumas células do cone ectoplacentário, mas não em todas as células espongiotrofoblásticas. Isso sugere que talvez as células

glicogênicas e espongiotrofoblásticas tenham progenitores próprios especificados na fase de cone ectoplacentário aos 7,5 dg. Isso mostra que tanto o cone ectoplacentário quanto o espongiotrofoblasto são compostos por diferentes tipos celulares que ainda estão sendo identificados (Bouillot et al, 2006; Cross et al, 2003; Mould et al, 2012; Outhwaite et al, 2015; Simmons, 2014).

As células derivadas do cone ectoplacentário produzem vários hormônios incluindo membros da família de proteínas semelhantes à prolactina. Cada célula possui um repertório diferente desses hormônios sugerindo diferentes funções de regulação endócrina da interface materno-fetal (Simmons et al, 2008b). As células espongiotrofoblásticas formam a camada média da placenta e são importantes para a morfogênese do labirinto e sugerido para o desenvolvimento do “instinto materno” (*sic*), embora seus mecanismos de ação sejam pouco compreendidos (Glynn et al, 2007; Oh-McGinnis et al, 2011). As células trofoblásticas glicogênicas invadem a decídua na segunda metade da gestação de camundongos de forma difusa e intersticial, onde acredita-se que ela funcione como um reservatório de energia (glicogênio) para o crescimento fetal (Rai & Cross, 2014). As CTG secundárias formadas a partir do cone ectoplacentário, por sua vez, vêm sendo amplamente exploradas. Assim como as CTG primárias, elas são largas, poliploides por endorreplacação e secretam metaloproteinases que auxiliam sua invasão na decídua basal. Elas também secretam hormônios e fatores importantes para a fisiologia da gestação, como fatores angiogênicos, vasodilatadores, anticoagulantes, hormônios luteotróficos e lactogênicos, e interferons (Bevilacqua et al, 2014a; Simmons et al, 2007; Soncin et al, 2015).

As CTG ficam ao redor de espaços de sangue materno e algumas, inclusive, substituem as células endoteliais das artérias espiraladas como parte do processo de remodelamento e adaptação à gestação (Rai & Cross, 2014). As CTG foram classificadas em quatro subtipos de acordo com a sua localização e do repertório de genes/proteínas relacionados à prolactina que possuem, os quais podem ser Prl3d1 (PI1), PI2, Prl2c2 (Plf) ou Ctsq (Fig. 1.12). As CTG parietais (CTG-P) revestem externamente o sítio implantacional e fazem parte da zona de junção da placenta madura. Elas são formadas tanto por CTG primárias do trofocotoderma mural quanto por CTG secundárias e expressam PI1, PI2 e Plf (Adamson et al, 2002; Cross et al, 2002; Simmons et al, 2007). Os outros quatro subtipos de CTG são formados apenas por CTG secundárias oriundas do trofocotoderma polar. Eles são: CTG

associadas às artérias espiraladas (CTG-SpA), que expressam apenas Plf; CTG associadas aos canais que conduzem o sangue materno das artérias espiraladas para o labirinto (CTG-C), que expressam Plf e Pl2; CTG ao redor de sinusoides de sangue que conduzem o sangue pobre em oxigênio para fora do labirinto (CTG-S) que expressam Pl2 e Ctsq, como mencionado anteriormente; e CTG que formam túneis que coletam o sangue das S-CTG para o seio venoso da decídua (CTG-Ch), e que expressam Pl1 e Plf (Hu & Cross, 2011; Rai & Cross, 2014; Soncin et al, 2015). Apesar de as CTG secundárias não expressarem Tpbpa após a diferenciação terminal *in vivo*, a diferenciação destas células a partir de células tronco trofoblásticas *in vitro* passa por uma fase em que as células expressam essa proteína. De fato, estudos de rastreamento de linhagens celulares mostrou que uma parte das CTG-P, CTG-SpA e CTG-C vêm de precursores Tpbpa⁺, enquanto a outra parte destas células e todas as CTG-S são originadas de precursores Tpbpa⁻ (Mould et al, 2012; Rai & Cross, 2014; Simmons et al, 2007).

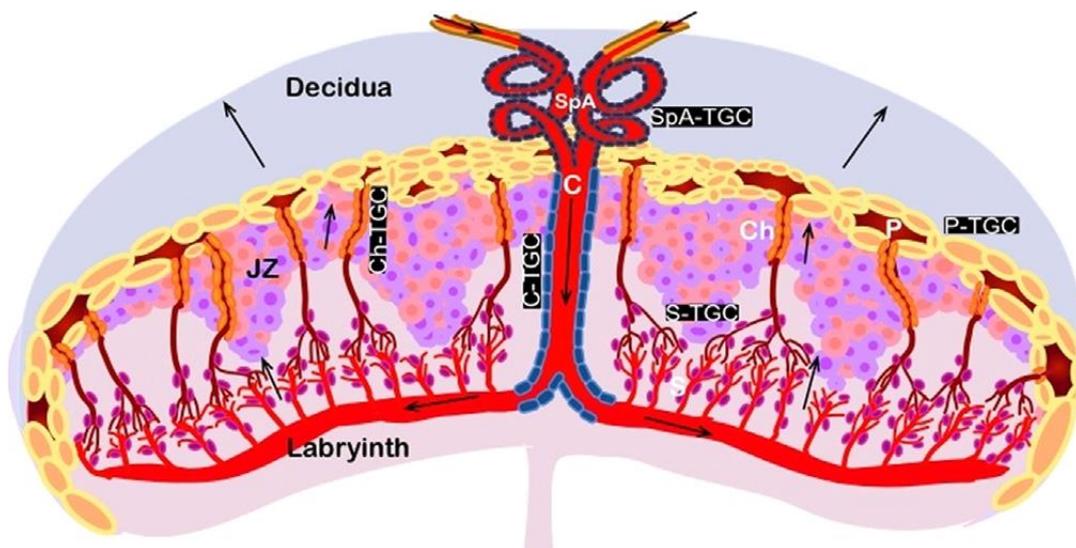


Figura 1.12. Estrutura da placenta de camundongos na metade da gestação mostrando a localização das células trofoblásticas gigantes (TGC) delimitando espaços de sangue materno. As setas indicam a direção do sangue materno. C: canal materno; TGC parietais (TGC-P); TGC associadas às artérias espiraladas (TGC-SpA); TGC associadas aos canais que conduzem o sangue materno das artérias espiraladas para o labirinto (TGC-C); TGC ao redor de sinusoides de sangue que conduzem o sangue pobre em oxigênio para fora do labirinto (TGC-S); TGC que formam túneis que coletam o sangue das S-TGC para o seio venoso da decídua (TGC-Ch). Extraído de Rai e Cross (2014).

Além do programa genético intrínseco, o desenvolvimento das células trofoblásticas também é regulado por fatores extrínsecos. Entre eles, o nível de oxigênio é um fator importante para a proliferação e diferenciação das diferentes populações trofoblásticas da placenta humana e de camundongos. Cultura de células tronco trofoblásticas se diferenciam em espongiotrofoblasto sob baixas

concentrações de oxigênio, enquanto elas tendem a se diferenciar em células trofoblásticas gigantes em concentrações mais elevadas de oxigênio. *In vivo*, mutações em camundongos que levam à diminuição da expressão de fatores de transcrição induzidos por hipóxia, como o Hif1, também resultam na diminuição da camada espongiotrofoblástica enquanto o número de CTG é aumentado (Adelman et al, 2000; Cross, 2005; Cross et al, 2003).

1.3.2.3 Circulação materna e fetal na placenta

A placenta possui duas circulações sanguíneas - fetal e materna - organizadas próximas entre si para facilitar a troca de nutrientes e gases (Fig.1.13) (Rai & Cross, 2014). Na interface materno-fetal, o fluxo sanguíneo aumenta na decídua basal em direção ao sítio implantacional devido ao crescimento de vasos sanguíneos por angiogênese e devido à vasodilatação coordenada por CTG e células NK uterinas (uNK) que secretam diversos fatores angiogênicos e vasodilatadores. O processo de remodelamento das artérias maternas envolve a perda da camada muscular destes vasos bem como a substituição das células endoteliais por CTG, um processo conhecido como “invasão vascular e mimetismo endotelial” (Cross et al, 2002; Rai & Cross, 2014). Não só nas artérias espiraladas, mas em toda a placenta, os espaços contendo sangue materno são envolvidos por CTG e não endotélio (placenta hemocorial; Fig. 1.12) (Simmons et al, 2007).

O sangue materno chega ao útero através de artérias radiais que se ramificam em 5 a 10 artérias espiraladas (Fig. 1.12). Estas artérias perdem o revestimento de musculatura lisa e elastina e são revestidas internamente por CTG-SpA que substituem as células endoteliais. Estas artérias se unem em 1 a 4 canais arteriais centrais na altura da zona de junção, os quais são revestidos pelas CTG-C e levam o sangue diretamente à base do labirinto. Nessa região próxima à placa coriônica, o sangue materno se distribui em canais sinusoides pequenos e delimitados por CTG-S que se estendem radialmente em direção à zona de junção. Nessa região, os sinusoides se unem e desembocam em seios venosos da decídua delimitados por células endoteliais (Adamson et al, 2002; Simmons et al, 2007). Já o sangue fetal, delimitado por células endoteliais, atravessa o labirinto na direção oposta à circulação materna, para a troca de gases em contracorrente (Fig. 1.13). Nesse processo, o sangue pouco oxigenado do feto circula em arteríolas que

chegam da placa coriônica indo direto para a região próxima ao espongiotrofoblasto aonde se ramificam em pequenos capilares que retornam à base da placenta e cordão umbilical. Em contrapartida, o sangue da mãe, rico em oxigênio, vai direto para a base da placenta e então se distribui nos sinusoides em direção oposta à corrente sanguínea fetal, o que otimiza a troca de gases (Adamson et al, 2002).

Maternal and fetal circulations

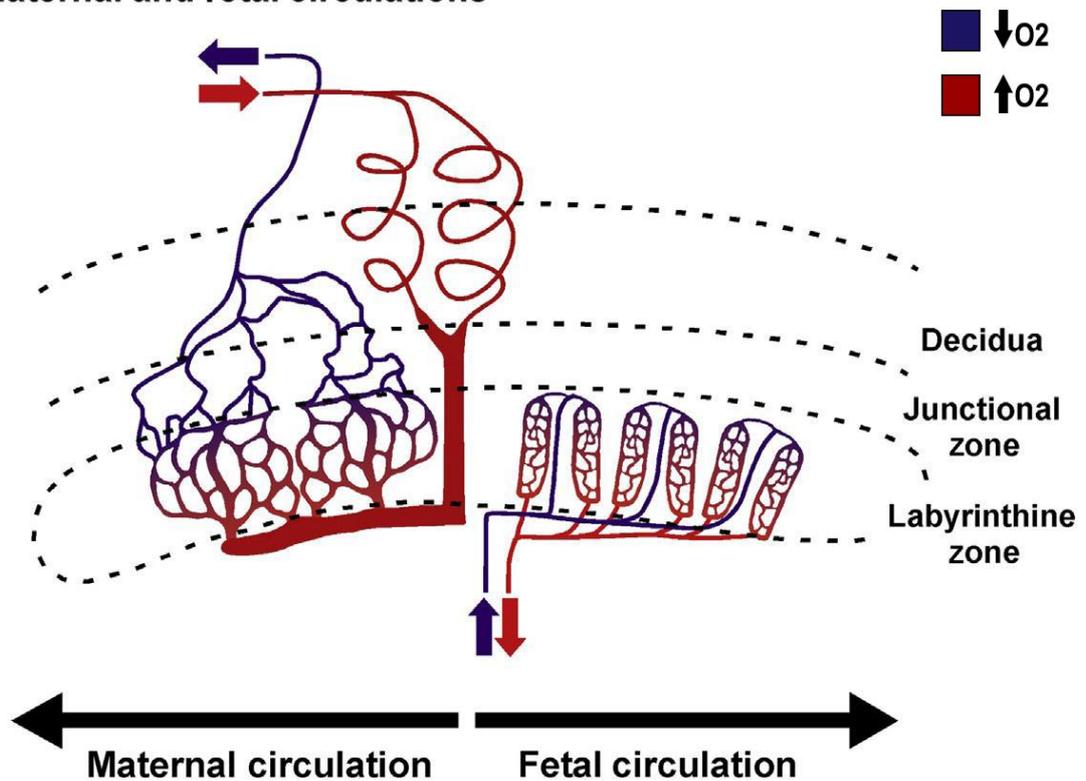


Figura 1.13. Organização contracorrente das circulações materno e fetal da placenta. A circulação materna encontra-se representada no lado esquerdo da imagem. As artérias espiraladas transportam o sangue materno à decídua. Elas se unem para formar um ou quatro canais centrais que levam o sangue à base da placenta. A circulação fetal encontra-se representada no lado direito da imagem. O sangue oxigenado atravessa o labirinto da base para a zona de junção no interior de canais sinusoides. O sangue fetal pobre em oxigênio chega na placa coriônica da placenta através das artérias umbilicais e se ramificam radialmente. O sangue fetal chega até a porção distal do labirinto e retorna por uma rede de capilares até se conectar com a veia umbilical. Adaptado de Simmons (2014).

1.3.3 Hematopoese na placenta

Um grande número de CTH foi encontrado na placenta humana e de camundongos revelando que este órgão também poderia funcionar como sítio hematopoético. Mais do isso, alguns autores sugerem que a placenta de camundongos consiste em um importante sítio de produção e expansão das CTH

sem induzir sua diferenciação (Rhodes et al, 2008). Estudos de transplantes conduzidos na década de 1960, utilizando células da placenta, sugeriram pela primeira vez que a placenta de camundongos tinha potencial hematopoético (Dancis et al, 1968; Dancis et al, 1962). Apesar disso, foi somente após a descoberta de atividade hematopoética na alantoide de aves que a hematopoese na placenta começou a ser explorada (Caprioli et al, 1998; Caprioli et al, 2001). Isso porque a alantoide contribui para a formação vascular da placenta corioalantoica de alguns mamíferos, incluindo humanos e roedores (Rossant & Cross, 2001). Desde então, alguns autores mostraram através das técnicas de cultura de células e ensaios funcionais que a placenta de camundongos durante a metade da gestação contém progenitores hematopoéticos multipotentes e de origem fetal (Alvarez-Silva et al, 2003) e também CTH em quantidades superiores às aquelas observadas nos outros órgãos hematopoéticos embrionários (Gekas et al, 2005; Ottersbach & Dzierzak, 2005). Entretanto, uma vez que nessa idade os fetos já possuem batimentos cardíacos, não foi possível determinar se os progenitores e CTH eram produzidos *in situ* ou se eram oriundos de outro local anatômico e haviam chegado à placenta pela circulação sanguínea.

Técnicas de imunohistoquímica e o uso de camundongos transgênicos também vêm sendo utilizados por alguns autores na tentativa de elucidar a origem exata dos progenitores encontrados na placenta. Ottersbach e Dzierzak (Ottersbach & Dzierzak, 2005) identificaram possíveis progenitores imaturos coexpressando Sca-1 e CD34 ou Sca-1 e CD31 em algumas células endoteliais de vasos sanguíneos da placa coriônica e no labirinto durante a metade da gestação. Um pouco depois, Rhodes e colaboradores (Rhodes et al, 2008) utilizaram um modelo de camundongo *knockout* para *Ncxl*, cujos embriões não possuem batimentos cardíacos. A análise imunohistoquímica nesses embriões com 9,5 dg revelou a presença de células CD41⁺ associadas a vasos fetais da região de labirinto e do mesênquima corioalantoico, embora em menor quantidade que as placentas controle. Uma vez que a integrina CD41 normalmente é encontrada nas CTH produzidas nos grandes vasos intraembrionários, os autores propuseram que a placenta é capaz de produzir pelo menos uma parte dos progenitores hematopoéticos de forma autônoma. Avaliações adicionais sobre estas células não foram realizadas, pois os embriões *Ncx1^{-/-}* possuem retardo no desenvolvimento e morrem aos 10,5 dg. Estes mesmos autores complementaram suas análises utilizando um camundongo *knock-in* Runx-1-LacZ para ajudar na identificação de possíveis CTH, já que o fator de transcrição

Runx-1 é fundamental para a produção destas células. Muitas células do mesênquima corioalantoico e do labirinto foram positivas, enquanto alguns clusters de células Runx1⁺ no interior dos vasos da placa coriônica também expressaram CD41. Os pesquisadores sugeriram que os vasos placentários poderiam produzir CTPH e que também poderiam proporcionar um microambiente favorável à expansão, sem induzir a diferenciação destas células (Rhodes et al, 2008). Por fim, um dos trabalhos mais recentes em camundongos mostrou *clusters* de células associadas ao endotélio dos vasos do labirinto da placenta coexpressando os marcadores CD31/c-Kit ou CD34/c-Kit (Sasaki et al, 2010). Da mesma forma, em humanos, a placenta também parece possuir potencial hematopoético (Bárcena et al, 2009; Robin et al, 2009). Além disso, foi recentemente descoberta realizando vasculogênese e eritropoese primitiva, de forma semelhante ao saco vitelínico durante a primeira onda de produção hematopoética (Aplin et al, 2015).

1.4 Justificativa

A complexidade do desenvolvimento embrionário é reflexo da necessidade de formar um indivíduo geneticamente único a partir de uma célula, o zigoto. Esse processo ocorre em alta velocidade e grande organização, de modo que entre a implantação do blastocisto no útero e o nascimento de um camundongo, por exemplo, se passam apenas cerca de 15 dias. Para que esse processo seja bem-sucedido, uma série de eventos de programação e reprogramação gênica ocorrem em sequência, de modo a formar os diferentes tipos celulares que constituirão o organismo maduro. Em mamíferos, um órgão fundamental para o sucesso da gestação é a placenta. Essa, além de possibilitar a adaptação do organismo materno para gerar indivíduos semialogênicos, produz uma série de hormônios que influenciam diretamente a organogênese embrionária e fetal. No entanto, dentre os processos que compõem tal organogênese, não havia menção explícita à hematopoeese. Embora haja três trabalhos na década de 1960 de transferência celular, apenas após a definição do potencial hematopoético da alantoide, já nos anos 2000, é que a placenta passou a ser implicada como importante na produção e principalmente na expansão de células tronco comprometidas com as linhagens hematopoéticas.

Todavia, o grande impacto potencial dessa constatação contrasta com a escassez de artigos que falam sobre a hematopoese na placenta. Nesse sentido, há poucos estudos nessa área e ainda pouco se conhece sobre o fenótipo das células encontradas na placenta, sua contribuição para o organismo adulto, o nicho ou os progenitores placentários. A dificuldade em estudar o local exato de produção das células hematopoéticas após o estabelecimento da corrente sanguínea soma-se à ausência de características morfológicas e fenotípicas específicas destas células, bem como à rapidez com que os eventos morfogenéticos ocorrem durante a vida embrionária. Ainda, a literatura focaliza principalmente no surgimento das células hematopoéticas ou seu destino final e, com isso, há uma enorme lacuna de conhecimento sobre a evolução destas células nas etapas intermediárias.

O modelo murino é bastante utilizado para estudar a hematopoese por possuir vantagens, como a manipulação genética para o rastreamento de células e transplante. Além disso, a hematopoese é um processo bastante conservado evolutivamente e, por isso, camundongos foram os animais mais utilizados nos trabalhos de hematopoese na placenta. Devido à complexidade do tecido placentário e à natureza migratória das CTPH, nos propusemos a realizar uma análise morfológica sistemática de placentas de camundongo na metade da gestação para compreender melhor seu microambiente e encontrar possíveis focos hematopoéticos e sua topografia *in situ*. Ao longo do mestrado, analisamos cortes histológicos da placenta de camundongos Swiss Webster entre 9,5 e 12,5 dg e observamos que somente a região de labirinto em placenta com 10,5 e 11,5 dg pareceu ser um local sugestivo de atividade hematopoética, onde encontramos principalmente indícios de hematopoese restrita à linhagem eritroide.

Dando continuidade ao trabalho, nesta tese, decidimos aprofundar esses achados caracterizando fenotipicamente as células imaturas e linhagens hematopoéticas da placenta, de forma a elucidar as etapas de formação das células do sangue. Nos concentramos nas idades gestacionais de 10,5 e 11,5 dg, mas ao mesmo tempo nos preocupamos em analisar placentas de outras idades gestacionais para ajudar a compreensão do fenômeno. A análise histológica e caracterização imunofenotípica foi bastante importante para contextualizar as informações que a literatura traz e para definir os experimentos subsequentes e determinar alvos moleculares para análise de expressão gênica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a atividade hematopoética da placenta de camundongos durante a metade da gestação.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar sistematicamente a morfologia placentária através de cortes histológicos seriados e semi-seriados e usando colorações histológicas convencionais e específicas para avaliar a presença de sítios de atividade hematopoética e sua topografia neste órgão;
- Caracterizar por imunohistoquímica e imunofluorescência as populações celulares encontradas, bem como o nicho hematopoético na placenta;
- Demonstrar o potencial de diferenciação vascular e hematopoética do cone ectoplacentário da placenta de camundongos a partir de experimentos de enxerto heterólogo subcapsular renal;
- Caracterizar o perfil da expressão gênica das células hematopoéticas imaturas CD41⁺ da placenta após seu isolamento por microdissecção a laser, buscando evidências moleculares da sua origem embrionária e o grau de diferenciação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados camundongos de diferentes linhagens. Camundongos Swiss Webster (SW) e C57BL/6 (B6) foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz e manuseados no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz (LABPAT/IOC) seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; licença LW-44/13). Os demais camundongos foram manipulados na Queen's University, seguindo as normas da Comissão de Cuidados Animais desta Universidade (UACC, do inglês *University Animal Care Committee*). Estes incluíram camundongos B6 obtidos junto à Charles River Canada (St. Constant, QU, Canadá) e outras três linhagens de camundongos geneticamente modificados: camundongos BALB/c-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (Balbc-GFP), C57BL6 PGF^{-/-} (*Pgf^{f/-}*) e camundongos BALB/c-*Rag2^{-/-}/γc⁻* (*Rag^{-/-}γc⁻*). Os camundongos Balbc-GFP expressam ubiquamente a proteína verde fluorescente (GFP) e foram adquiridos junto ao Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Camundongos *Pgf^{f/-}* foram desenvolvidos e doados pelo Dr Peter Carmeliet do *Center Transgene Technology & Gene Therapy, Flanders Interuniversity, Institute for Biotechnology, University of Leuven*, na Bélgica. Estes animais são *knockout* para o gene *Pgf* (do inglês *Placental growth factor*), por meio da deleção dos éxons 3-6 do gene *Pgf* localizado no Cromossomo 14. Os camundongos imunocomprometidos *Rag^{-/-}γc⁻* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Chandrakant Tayade da Queen's University e carecem de células NK e linfócitos T e B devido a mutações em *Rag2* (do inglês *Recombinase activating gene-2*) e na cadeia γ comum de receptores de citocinas (CD132).

Todos os animais foram mantidos em ciclos de 12 h claro-escuro e receberam comida e água *ad libitum*. Os camundongos *knockout* foram mantidos em gaiolas com microisolador autoclavadas contendo maravalha, água e ração estéreis. Os camundongos imunocomprometidos *Rag^{-/-}γc⁻* foram, além disso, mantidos em instalações livres de germes (bioBUBBLETM, Fort Collins CO; Gaiola de ventilação positiva com filtro HEPA, Allentown Inc., Allentown NY). A criação em barreira incluiu troca de ar oito vezes a cada hora e temperatura constante de 23°C. Além disso,

eles receberam em dias alternados água obtida por osmose reversa autoclavada e acidificada (pH 2,9) ou água suplementada com sulfametoxazol e trimetoprim.

Para obtenção de fêmeas grávidas, foram realizados acasalamentos singênicos, bem como acasalamentos alogênicos entre fêmeas B6 com machos Balbc-GFP. A estratégia de acasalamento foi a mesma para todos os animais, na qual camundongos fêmeas foram colocadas na presença do camundongo macho e a detecção do tampão vaginal na manhã do dia seguinte definia o dia gestacional (dg) 0,5. Foram utilizadas fêmeas em diferentes idades gestacionais de acordo com o objetivo pretendido.

3.2 Análise morfológica

3.2.1 Coleta de tecidos para estudo histológico

Camundongos possuem uma gestação de aproximadamente 20 dias. Para a análise morfológica da placenta, foram coletados sítios implantacionais de camundongos fêmeas SW, B6 e *Pgf^{-/-}*. Foram coletados 50 camundongos SW fêmeas grávidas com 9,5 dg (n=7), 10,5 dg (n=25), 11,5 dg (n=14) 12,5 dg (n=3) e 14,5 dg (n=1); camundongos B6 fêmeas grávidas com 10,5 dg que acasalaram com machos B6 (n=6) ou Balbc-GFP (n=6); e oito *Pgf^{-/-}* fêmeas grávidas com 10,5 dg (n=5) e 11.5 dg (n=3).

No dia correspondente à idade gestacional de interesse, os camundongos foram eutanasiados por administração intraperitoneal de Cetamina-Xilazina (120 mg/Kg-16 mg/Kg em 0,04 mL) ou Pentobarbital sódico em dose letal (100 mg/Kg), ou ainda por deslocamento cervical. Após a constatação da morte do animal, foi realizada laparotomia para exposição do útero gravídico e coleta dos sítios implantacionais. A análise macroscópica consistiu na contagem e análise de viabilidade de cada sítio implantacional, determinada pelo tamanho e cor. Fetos em processo de reabsorção – menores e com cor vermelho intenso – foram coletados, mas não fizeram parte deste estudo. Cada fêmea SW possuía aproximadamente 12 sítios implantacionais viáveis enquanto as fêmeas das outras linhagens possuíam 8-10 sítios implantacionais viáveis, os quais foram utilizados para confecção de blocos parafinados ou blocos congelados. Os órgãos de algumas fêmeas grávidas também foram coletados, mas, com exceção de alguns baços que foram usados para

controle positivo de algumas imunomarcações, não foram analisados no presente estudo.

3.2.2 Produção de blocos histológicos

A análise morfológica exploratória da placenta em busca de focos hematopoéticos foi realizada inicialmente em camundongos SW. Por isso, foi priorizada a obtenção de blocos parafinados para os tecidos de camundongos SW, de forma que todos os sítios implantacionais incluídos em parafina destes animais foram analisados. Alguns sítios implantacionais de fêmeas SW com 10,5 dg foram coletados para obtenção de blocos congelados. Todos os órgãos maternos dos camundongos SW foram coletados e incluídos em parafina, embora não tenham sido analisados para o presente estudo.

Já os sítios implantacionais dos camundongos B6 fêmeas que acasalaram com machos B6 ou Balbc-GFP foram utilizados preferencialmente para obtenção de blocos congelados. Apenas alguns sítios implantacionais de cada cruzamento (B6xB6 e B6xBalbc-GFP) foram destinados à inclusão em parafina. O baço das fêmeas grávidas também foi coletado e congelado para controle positivo de imunomarcações.

Entre os camundongos *Pgf^{-/-}*, quatro sítios implantacionais de cada fêmea grávida foram congelados enquanto os demais sítios implantacionais foram processados para inclusão em parafina. O baço destas fêmeas também foi coletado, com uma parte destinada para congelamento e a outra para obtenção de blocos parafinados, mas também não fizeram parte do escopo deste trabalho.

- **Obtenção de blocos parafinados**

Para obtenção de blocos parafinados, os sítios implantacionais coletados foram fixados em formalina em tampão Millonig a 10%, pH 7,3 modificado por Carson (Carson et al, 1973) por 48 h à temperatura ambiente. Após a fixação e clivagem sagital dos sítios implantacionais, estes foram lavados em água corrente por aproximadamente uma hora e mantidos em etanol 50%. O material foi colocado em processador automático de tecidos Citadel 2000® (Shandon) programado para banhos sucessivos de: desidratação em álcool etílico (um banho de álcool 70%, um

banho de álcool 95% e cinco banhos de álcool 100%; 1 h 30 min cada), clarificação em xilol (dois banhos; 1 h 30 min cada) e impregnação em parafina líquida 2°C acima do ponto de fusão (dois banhos; 1 h 30 min cada).

Alternativamente, os tecidos foram fixados a 4°C em Paraformaldeído (PFA) 4% por 24h e então mantidos a 4°C em álcool etílico 70%. Os sítios implantacionais foram, então, clivados sagitalmente e colocados em processador automático de tecidos RTP™ (Triangle Biomedical Sciences) programado para banhos sucessivos de: desidratação em álcool etílico (dois banhos de álcool 70%, um banho de álcool 80%, um banho de álcool 95% e quatro banhos de álcool 100%; 45 min cada), clarificação em xilol a 40°C (dois banhos; 45 min cada) e impregnação em parafina líquida a 60°C (quatro banhos; 45 min cada). Após o processamento, todas as amostras foram incluídas em parafina utilizando o inclusor de tecidos Histocentre 2 (Shandon) com a face sagital do corte orientada para baixo.

- **Obtenção de blocos congelados**

Para congelamento, cada sítio implantacional foi colocado em um criomolde contendo OCT (Tissue-tek ou Thermo Scientific™ Shandon™ Cryomatrix™), sem fixação ou clivagem prévia. Após o congelamento rápido em nitrogênio líquido, as amostras foram mantidas em freezer -20°C ou ultrafreezer -80°C. O baço materno também foi coletado, clivado e congelado de forma semelhante para controle positivo de algumas imunomarcações.

3.2.3 Microtomia e coloração

- **Blocos parafinados**

Dos blocos parafinados foram obtidos cortes histológicos seriados e semi-seriados em micrótomo rotativo HM 325 (Microm), com espessura de 5 µm, que foram colocados em lâminas limpas, previamente revestidas com albumina, visando técnicas de coloração histológica, ou silano, para imnohistoquímica e imunofluorescência.

Foram cortadas inicialmente 12 lâminas de cada bloco, das quais a 1ª e a 11ª foram coradas pela técnica de coloração por hematoxilina-eosina (HE) e em seguida analisadas em microscópio de campo claro. Alguns dos demais cortes foram

corados por Giemsa de Lennert. Quando arranjos hematopoéticos foram localizados na microscopia de campo claro, lâminas adicionais de cada bloco foram obtidas para o aprofundamento do corte e/ou imunomarcação para caracterização do sítio hematopoético da placenta.

Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (Mayer, 1903)

Esta técnica tem por objetivo fornecer a visualização do aspecto morfológico geral das estruturas em análise. Os tecidos foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico (três banhos de álcool 100%, um de 95% e um de 70%) e lavados em água destilada. Procedeu-se a coloração pela hematoxilina de Mayer por 20 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 25 minutos. Posteriormente, os cortes foram desidratados em álcool etílico a 70% por três minutos. A seguir, foram submetidos à coloração pela eosina-floxina por dois minutos. Após rápida lavagem em álcool etílico a 95%, os cortes foram desidratados em três banhos de álcool etílico 100%, clarificados em três banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se goma de Damar como meio de montagem. Através do emprego desta técnica de coloração, as estruturas basófilas, como o núcleo, se coram em azul e as estruturas acidófilas, como citoplasma, coram-se em rosa.

Técnica de coloração pelo Giemsa de Lennert (Lennert, 1978)

Esta técnica de coloração regressiva do tipo Romanowsky, tem por objetivo permitir a diferenciação das diversas linhagens hematopoéticas, a partir da evidência diferencial dos componentes celulares. As estruturas basófilas, como o núcleo, coram-se em azul escuro e as estruturas acidófilas, como citoplasma, grânulos basófilos e neutrofílicos coram-se em azul mais claro. As hemácias e os grânulos eosinofílicos coram-se em rosa. Os grânulos de mastócitos coram-se desde tonalidades arroxeadas a róseas. Para essa técnica de coloração, os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico (três banhos de álcool 100%, um de 95% e um de 70%) e lavados em água destilada. Após a desparafinização, os cortes foram então corados em solução de Giemsa a 20% por 1 hora e diferenciados em solução de ácido acético 0,5%, desidratados em álcool etílico 95% e três banhos de álcool isopropílico 100%, clarificados em três banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se goma de Damar como meio de selagem.

- **Blocos congelados**

Foram feitos cortes seriados de 6 µm em criostato CM1850 UV ou CM1510 S (Leica), que foram colocados em lâminas limpas previamente revestidas com silano. Os cortes congelados foram destinados à imunomarcção de determinados anticorpos importantes para o aprofundamento da caracterização da hematopoese na placenta. Eles também foram submetidos a protocolo de imunohistoquímica para avaliar a frequência das células imaturas hematopoéticas da placenta identificadas com o anticorpo anti-CD41, uma glicoproteína transmembrana presente em progenitores hematopoéticos durante o desenvolvimento embrionário.

3.2.4 Imunofluorescência: marcação simples

As lâminas contendo cortes parafinados foram primeiro desparafinizadas em três banhos de xilol por 10 min cada e em seguida hidratadas em banhos decrescentes de álcool etílico por 5 min cada e mais 5 min em água destilada. A recuperação antigênica dos cortes parafinados foi feita por digestão enzimática com proteinase K ou por calor em câmara Pascal (Dako®, EUA), micro-ondas ou aparelho de cozimento a vapor, utilizando tampão citrato pH 6,0 ou Tris-EDTA pH 9,0. Já as lâminas contendo os cortes congelados foram fixadas em acetona por 15 min a -20°C e em seguida deixadas para secar em temperatura ambiente por mais 15 min e, então, lavadas em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. Em alguns cortes foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas por 20 (cortes parafinados) ou 40 minutos (cortes congelados), utilizando CAS-block™ (00-8120, ThermoFisher Scientific) ou albumina de soro fetal bovino (BSA), com ou sem adição de leite em pó.

Após o bloqueio, as etapas seguintes de imunofluorescência foram as mesmas para os cortes parafinados e congelados. Os cortes foram incubados com diferentes anticorpos primários ou lectina (Tabela 3.1) em câmara úmida durante a noite por aproximadamente 14 h a 4°C ou por 1 h a 37°C, dependendo do anticorpo. Nos controles negativos, esta incubação foi feita com PBS ou isotipo. Para os anticorpos primários não-conjugados a fluoróforo, foi necessária uma segunda incubação de 1 h a 37°C com anticorpos secundários ligados a fluoróforo para reconhecimento de imunoglobulinas de diferentes espécies de animais do anticorpo

primário (Tabela 3.2). Após três lavagens em PBS, alguns cortes foram contracolorados com azul de Evans por 1 min (1:10.000, Sigma) e DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; 1:5.000 ou 1: 10.000, Life Technologies) por 10 min seguida da montagem com lamínula, utilizando meio de montagem Prolong Gold (P36934, Life Technologies). Outros cortes foram montados diretamente com lamínula utilizando meio de montagem Prolong Gold já contendo DAPI (P36931, Life Technologies).

Tabela 3.1. Anticorpos primários e lectina utilizados na imunomarcção.

Anticorpo anti-	Descrição *	Catálogo	Especificidade
CD31 (PECAM)	AcPo de coelho	ab28364 abcam	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária expressa por células endoteliais, plaquetas e leucócitos
CD41 [MWRReg30] - FITC	AcMo de rato	133903 Biolegend	Integrina α IIb presente em plaquetas, megacariócitos e células tronco e progenitores hematopoéticos
CD71 (H-300)	AcPo de coelho	sc-9099 St Cruz	Receptor de transferrina envolvido na captação de ferro. Presente em precursores eritroides
Citoqueratina 8+18 [EP1628Y]	AcMo de coelho	ab53280 abcam	Reconhece os filamentos intermediários de citoqueratina 8 e 18 de células epiteliais
c-Kit, CD 117, [YR145]	AcMo de coelho	117R-15 Cell Marque	Receptor de células tronco e progenitores hematopoéticas que se liga ao SCF
EPO (N-19)	AcMo de cabra	sc-1310 St Cruz	Hormônio glicoproteico que regula a eritropoese
Hepcidina-25	AcPo de coelho	ab30760 abcam	Peptídeo importante na homeostase do ferro
Ki67	AcPo de coelho	ab15580 abcam	Proteína nuclear expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M)
LYVE1	AcPo de coelho	ab14917 abcam	Do inglês <i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i> , presente em células endoteliais dos vasos linfáticos
Pan-caderina (C-19)	AcPo de cabra	sc-1499 St Cruz	Reconhece as moléculas de adesão celular: P-cadherin, N-cadherin, E-cadherin, K-cadherin, M-cadherin e R-cadherin
Pan-citoqueratina [AE1/AE3 + 5D3]	AcMo de camundongo	ab86734 abcam	Reconhece os filamentos intermediários de citoqueratina 1, 4, 5 e 6 de células epiteliais
RUNX1/AML1	AcPo de coelho	ab35962 abcam	Fator de transcrição importante para a hematopoese
Sca1/Ly6A/E [D7] - FITC	AcMo de rato	ab25031 abcam	Do inglês <i>Stem cell antigen-1</i> , uma proteína de superfície das células tronco e progenitores hematopoéticos
Tpbpa	AcPo de coelho	ab104401 abcam	Do inglês <i>trophoblast specific protein alpha</i> , proteína específica das células espongiotrofoblásticas e seus precursores
Troma-I-s, EndoA	AcMo de rato	Hybridoma Bank	Reconhece os filamentos intermediários de citoqueratina-8 presente nas células trofoblásticas de camundongos
VEGF	AcPo de coelho	RB-9031-P1 ThermoFisher	Importante fator angiogênico e vasculogênico
Vimentina [EPR3776]	AcMo de coelho	ab92547 abcam	Filamento intermediário usado como marcador de células e tecidos derivados do mesoderma
vWF (Fator VIII-RA)	AcPo de coelho	250A-16 Cell Marque	Glicoproteína envolvida na agregação plaquetária importante para a homeostase. Presente no endotélio, plaquetas e megacariócitos
α -fetoproteína	AcPo de coelho	ab46799	Proteína produzida pelas células endodérmicas do saco vitelínico e fígado fetal durante o desenvolvimento

* Anticorpo monoclonal (AcMo), anticorpo policlonal (AcPo)

Fonte	Lectina	Catálogo	Especificidade
<i>Arachis hypogaea</i> conjugada a FITC	PNA (<i>Peanut agglutinin</i>)	L-7381	β -galactose (1→3) N-acetilgalactosamina

Tabela 3.2. Anticorpos secundários utilizados na imunomarcção.

Anticorpos secundários	Fluoróforo	Catálogo
Cabra anti-IgG de coelho	Alexa Fluor 488	A11008, Invitrogen
Jumento anti-IgG de cabra	Alexa Fluor 488	A11055, Invitrogen
Cabra anti-IgG de camundongo	Alexa Fluor 488	A11001, Invitrogen
Cabra anti-IgG de coelho	Alexa Fluor 546	A11010, Invitrogen
Cabra anti-IgG de camundongo	Alexa Fluor 546	A11005, Invitrogen
Cabra anti-IgG de coelho	Alexa Fluor 594	A11012, Invitrogen
Cabra anti-IgG de rato	Alexa Fluor 594	ab150160, abcam
Cabra anti-IgG de coelho	Alexa Fluor 635	A31576, Invitrogen
Coelho anti-IgG de rato	TRITC	T-4280, Sigma

Além destes, outros anticorpos contra antígenos hematopoéticos e do nicho hematopoético ou placentário foram testados, mas não funcionaram. Entre eles os anticorpos anti: CD45 (ab10558, abcam), β 1-espectrina (ab2808, abcam), CD34 (M7168, ThermoFisher), Flt-1/ VEGFR1 (RB-1527-P1, Life Technologies), Flk-1/KDR/VEGFR2 (RB-1526-P1, Life Technologies), ESAM (ab73988, abcam), hemoglobina (ab191183, abcam), EpoR (sc-697, St Cruz), Ter119 (09085B, Pharmingen), BMP4 (ab39973, abcam), CXCR4 (ab65156, abcam), HSD3B1 (ab65156, abcam), Conexina 43 (sc13558, St Cruz), VCAM1 (ab106777, abcam), Fall-3 (01581, Pharmingen), OB [A-2] (sc-842, St Cruz), OB-R [H-300] (sc-8325, St Cruz), Gr1-FITC (01214D, Pharmingen), CD68 (ab201340, abcam), Thy1-FITC (ab25672, abcam) e HIF1 α (sc-12542, St Cruz).

3.2.5 Imunofluorescência: dupla marcação

Para as marcações duplas, foram utilizados protocolos de dois ou três dias. As etapas iniciais da técnica foram as mesmas da imunofluorescência descrita anteriormente, até a incubação com o anticorpo primário. O primeiro anticorpo primário ou seu controle negativo sempre foi incubado em câmara úmida durante a noite por aproximadamente 14 h a 4°C. No dia seguinte, foi feita a lavagem em PBS e a incubação das lâminas com o primeiro anticorpo secundário ligado ao fluoróforo por 1 h a 37°C.

- **Protocolo de dupla marcação em dois dias**

Foi feita a lavagem do primeiro anticorpo secundário em PBS, seguida da incubação dos cortes com o segundo anticorpo primário, que podia ser ou não conjugado ao fluoróforo, por 1 h a 37°C. Para os anticorpos primários não-conjugados, foi necessária uma segunda incubação de 1 h a 37°C com anticorpos secundários ligados ao fluoróforo. Após três lavagens em PBS, os cortes foram contra corados com DAPI (1:5.000 ou 1:10.000, Life Technologies) por 10 min seguida da montagem com lamínula, utilizando meio de montagem Prolong Gold (P36934, Life Technologies).

- **Protocolo de dupla marcação em três dias**

Após a lavagem do primeiro anticorpo secundário em PBS, os cortes foram incubados em câmara úmida com o segundo anticorpo primário não conjugado ao fluoróforo durante a noite por aproximadamente 14 h a 4°C. No dia seguinte, foi feita a lavagem em PBS seguida da incubação com o segundo anticorpo secundário ligado ao fluoróforo. Após três lavagens em PBS, os cortes foram contra corados com DAPI (1:5.000 ou 10.000, Life Technologies) por 10 min e então montados com lamínula, utilizando meio de montagem Prolong Gold (P36934, Life Technologies).

Os anticorpos primários e secundários utilizados para as duplas marcações se encontram na tabela 3.1.

3.2.6 Análise, fotomicrografia e digitalização das lâminas

Os preparados histológicos obtidos pelas técnicas de coloração histológica e histoquímica foram analisados no LABPAT/ IOC em microscópio AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemanha), equipado com lentes objetivas: Plan-NEOFLUAR 10X/0,3; ACROPLAN 20X/0,45; Plan-NEOFLUAR 40X/1,3 oil DIC; ACHROPLAN 40X/0,65; Plan-APOCHROMAT 63X/1,4 oil (Zeiss). A documentação foi feita com câmera digital AxioCam mRc5 ou HRC (Carl Zeiss Vision, Alemanha). Adicionalmente, algumas lâminas foram escaneadas pelo equipamento VSlide (Metasystems, Alemanha) equipado com lente Plan-APOCHROMAT 20X/0,8 (Zeiss).

A análise dos preparados fluorescentes foi feita em microscópio de fluorescência M1 (Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera AxioCam (Zeiss, Canadá) da *Queen's University* e também no microscópio de varredura a laser confocal LSM 510 META (Zeiss, Alemanha) estruturado sob estativa Axiovert 200M, depois substituído pelo confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha) estruturado sob estativa AxioObserver Z2, da rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz.

3.3 Técnica de fluorescência em *Whole Mount*

Para a técnica de imunofluorescência em *Whole Mount* foram utilizadas placentas com 10,5 dg oriundas de camundongos fêmeas B6 que acasalaram com machos também B6. Depois de 10,5 dias da visualização do tampão vaginal, as fêmeas grávidas foram eutanasiadas para coleta das placentas. Após a laparotomia e macroinspeção do útero gravídico, este foi cortado transversalmente entre cada sítio implantacional. Cada sítio implantacional foi lavado em PBS e então dissecou-se a placenta utilizando magnificação do microscópio estereoscópio (Wild Heerbrugg). A placenta foi separada do miométrio, feto e cordão umbilical. Após a dissecação, a placenta foi então cortada sagitalmente para melhor penetração dos anticorpos.

As duas metades de cada placenta foram transferidas para um tubo Eppendorf contendo 200µl de PBA, uma mistura de PBS com BSA 1% e azida sódica 1%. Foram adicionados 10µg/mL de anticorpo de boqueio para o receptor Fc de IgG (anti-CD16/CD32; sobrenadante do hibridoma 2.4G2, ATCC) e 4µg/mL de anticorpo primário diretamente conjugado ao fluoróforo. Foram utilizados os anticorpos anti-CD31-PE [MEC13.3] (553373, BD Pharmingen) e anti-CD41-FITC [MWRReg30] (133903, Biolegend). Os tubos contendo as placentas foram colocados em um agitador orbital e incubados a 4°C durante 1 h protegidos da luz. Após esse período, 1ml de PBA foi adicionado ao tubo para diluir o anticorpo e parar a reação. As placentas foram, então, colocadas sobre lâminas de microscopia e cobertas com lamínula para análise imediata e registro do tecido em microscópio de fluorescência M1 (Zeiss, Alemanha) acoplado a câmera AxioCam (Zeiss, Canadá).

3.4 Imunohistoquímica e quantificação relativa das células CD41⁺ no labirinto da placenta

A quantificação dos progenitores hematopoéticos da região de labirinto da placenta foi feita através da contagem de células CD41 positivas obtidas após protocolo de imunohistoquímica. Foram utilizados blocos congelados de cinco sítios implantacionais oriundos de duas fêmeas B6 e de duas fêmeas *Pgf^{-/-}* com 10,5 dg. De cada bloco foram feitos cortes seriados de 6 µm em criostato CM1510 S (Leica). Foram selecionados e submetidos à imunohistoquímica dois cortes de cada sítio implantacional da região sagital da placenta com pelo menos 42 µm de distância para evitar a contagem repetida de células. A contagem do número total de células CD41⁺ foi feita por um único observador em microscópio de campo claro Eclipse E200 (Nikon) sob magnificação de 400x. A análise estatística foi realizada através do teste t de *student*. O cálculo estatístico e o gráfico representativo foram feitos no programa GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc.). Dados foram estatisticamente significantes quando as diferenças apresentaram valores de $P < 0,05$.

Técnica de Imunohistoquímica

Os cortes congelados foram fixados em acetona por 15 min a -20°C. Em seguida, as lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente por mais 15 min e então lavadas em PBS até a remoção completa do OCT. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por 5 min com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% antes do bloqueio de ligações inespecíficas com BSA e leite em pó. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-CD41 conjugado à biotina [MWReg30] (133930, Biolegend) ou seu isotipo (400403, Biolegend) por 1 h a 37°C. Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados novamente com estreptavidina (K0690, Dako) por 20 min à temperatura ambiente. A seguir, eles foram lavados em PBS e revelados com 3,3-diaminobenzidina (DAB; K3468, Dako) por 5 min. Os cortes foram lavados por 5 min em água destilada e contra corados por Hematoxilina de Harris (Wcor) por 1 min. Eles foram lavados por 5 min em água corrente e então, desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (álcool 70%, 95% e 100%), clarificados em dois banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se goma de Damar.

3.5 Administração de Eritropoetina humana recombinante (rhEPO) em fêmeas grávidas

A rhEPO foi sintetizada pela primeira vez em 1977 utilizando a tecnologia do DNA recombinante para clonar o gene humano da EPO (Miyake et al, 1977). Neste trabalho, foi utilizada rhEPO produzida e doada pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos/ Fiocruz). A rhEPO recebida e utilizada neste estudo corresponde à isoforma alfa da proteína, em concentração de 4.000 UI / ml e cuja meia vida é de 72 h (Nascimento et al, 2015). Quatro fêmeas SW receberam uma dose única de 500U (10U/g/dose) de rhEPO pela manhã por via subcutânea aos 9,5 dg. Duas fêmeas foram eutanasiadas 24 h depois (10,5 dg) e as outras duas após 48 h (11,5 dg) através da administração intraperitoneal de Cetamina-Xilazina (120 mg/Kg-16 mg/Kg em 0,04 mL). Foi realizada laparotomia para coleta dos sítios implantacionais, os quais foram utilizados para confecção de blocos parafinados conforma descrito anteriormente. Os órgãos das fêmeas grávidas também foram coletados, mas não foram analisados para este trabalho.

De todos os sítios implantacionais, foram obtidos 12 cortes histológicos seriados de cinco µm cada em micrótomo rotativo HM 325 (Microm). A 1ª e a 11ª lâminas foram coradas HE. Cortes seriados adicionais foram obtidos nos sítios implantacionais das fêmeas com 10,5 dg nos quais foram realizadas imunofluorescência simples e de dupla marcação conforme protocolo supracitado (3.2.6).

3.6 Enxerto subcapsular renal

3.6.1 Acasalamentos

Cones ectoplacentários (EPC) de embriões com 7,5 dg foram cirurgicamente implantados no espaço subcapsular renal de camundongos fêmeas grávidas Rag^{-/-}γc⁻. Para cada rim, foram inseridos dois EPC em um total de quatro enxertos por animal. Os fetos doadores do EPC foram obtidos a partir do acasalamento entre camundongos fêmeas B6 com machos Balbc-GFP, para que o enxerto pudesse ser identificado pela presença da proteína GFP. Para cada camundongo doador com 7,5

dg, procurou-se utilizar uma ou duas fêmeas $Rag^{-/}\gamma c^{-}$ grávidas como receptores, obtidas a partir de acasalamentos homólogos. Ao todo, 6 fêmeas B6 foram utilizadas como doadoras de cones ectoplacentários, enquanto 11 fêmeas grávidas $Rag^{-/}\gamma c^{-}$ receberam os enxertos.

3.6.2 Preparo do enxerto: dissecação do cone ectoplacentário

No dia do procedimento, as fêmeas grávidas doadoras foram eutanasiadas para realização de laparotomia. Os sítios implantacionais viáveis foram transferidos para placa de Petri contendo PBS estéril para dissecação sob magnificação de microscópio estereoscópio (Wild Heerbrugg). A parede uterina foi removida para retirada dos sítios implantacionais. Cada sítio implantacional compreendia o embrião revestido completamente pelas decíduas mesometrial e antimesometrial. Com o uso de uma pinça de dissecação muito fina (n°5), foi feita uma incisão longitudinal na extremidade antimesometrial da decídua, abrindo-a em duas metades para expor o embrião (Fig 3.1-A). O cone ectoplacentário se destacou dos tecidos embrionários pelo seu formato cônico e coloração avermelhada localizado na extremidade em contato com a decídua mesometrial (Fig 3.1-B). Os EPCs foram coletados e transferidos para nova placa de Petri contendo meio de cultura CFU-Hill (05901, StemCell Technologies), onde permaneceram em temperatura ambiente até que o animal receptor estivesse pronto para receber o enxerto. O cone ectoplacentário de camundongos aos 7,5 dg contém uma massa interna central de células diploides proliferativas (as células tronco trofoblásticas) e CTG periféricas (Bevilacqua et al, 2014b).

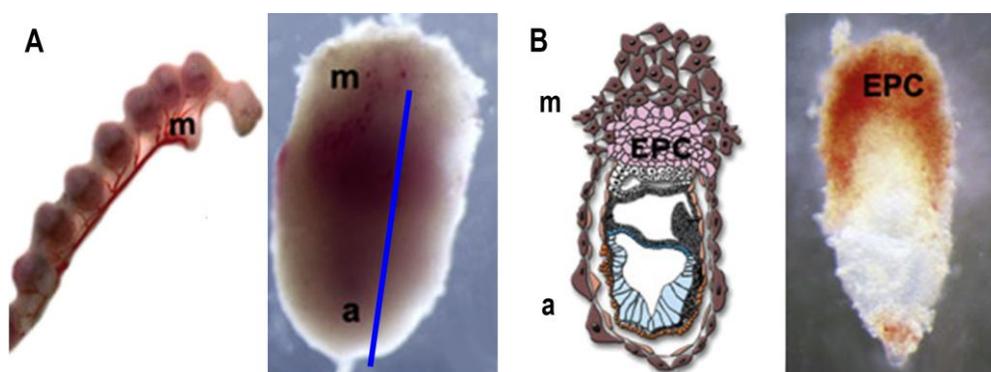


Figura 3.1. Dissecação do cone ectoplacentário (EPC). (A) Isolamento dos sítios implantacionais da musculatura uterina. A partir da extremidade antimesometrial (a) é feito um corte transversal parasagital representado pela barra azul. (B) Esquema representativo e o embrião após seu isolamento. O cone ectoplacentário é facilmente identificado com ajuda do microscópio estereoscópio pela cor avermelhada e formato cônico. m: decídua mesometrial. Adaptado de Bevilacqua et al (2014).

3.6.3 Implante do EPC no espaço subcapsular renal do camundongo receptor

Cada camundongo receptor recebeu uma dose de Meloxicam (1 mg/Kg), um anti-inflamatório não-esteróide, pertencente à classe do ácido enólico, por via subcutânea 30 minutos antes da sedação do animal por Pentobarbital sódico (85 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a tricotomia na região dorsal do quadril para então fazer uma pequena incisão na topografia do rim direito, a qual permitiu a exposição deste órgão. Com o auxílio de duas pinças cirúrgicas de ponta fina, foi produzida uma descontinuidade na superfície lateral da cápsula renal, onde o enxerto viria a ser inserido. Neste momento, dois EPC foram aspirados em uma micropipeta de vidro e então inseridos sob a cápsula renal, com cautela para respeitar distância da glândula suprarrenal. Com cuidado, o rim direito foi devolvido à cavidade abdominal e o mesmo procedimento foi realizado no rim esquerdo.

No final do procedimento, a incisão na pele foi fechada por grampos e os animais receberam 1 mL de solução fisiológica estéril por via subcutânea, no dorso. Os camundongos foram acompanhados até a recuperação da anestesia, sendo mantidos em placa aquecedora e com lubrificante nos olhos (Specicare Lubrithal). Durante esse período também foi realizada a mudança de decúbito periodicamente, como profilaxia de tromboembolia pulmonar. Eles ainda receberam Meloxicam (1 mg/Kg) uma vez ao dia durante os três dias que se seguiram à cirurgia.

3.6.4 Coleta, processamento e análise do enxerto

Os camundongos receptores que sobreviveram (n=8) foram eutanasiados três dias após a cirurgia para coleta do enxerto. Além dos rins contendo o enxerto, foram coletados os baços e sítios implantacionais das fêmeas que mantiveram a gestação, embora estes últimos não tenham sido analisados para o presente estudo. Os tecidos foram fixados em PFA 4% a 4°C por 24h e então mantidos em álcool etílico 70% até serem processados e incluídos em parafina em metodologia semelhante à supracitada (item 3.2.3). Apenas um enxerto e o baço do respectivo animal receptor foram coletados para congelamento rápido em nitrogênio líquido na presença de OCT, os quais foram então mantidos em ultrafreezer -80°C.

A presença e o crescimento do enxerto foram detectados macroscopicamente e pela imunomarcagem com o anticorpo anti-GFP (ab13970, abcam), em protocolo

de imunofluorescência semelhante ao descrito na seção 3.2.4. Dos blocos parafinados foram obtidos cortes histológicos de 5 µm em micrótomo rotativo HM 325 (Microm). Os blocos congelados foram cortados em criostato CM1850 UV ou CM1510 S (Leica) com espessura de 6 µm. A princípio foram obtidos três cortes de cada bloco. Destes, uma lâmina foi corada com HE. As outras duas foram destinadas à imunofluorescência, uma para detecção do enxerto com o anticorpo anti-GFP e a outra lâmina como controle negativo. Uma vez detectada a presença da proteína GFP nos enxertos, realizou-se imunofluorescência para detecção da proteína de espongiotrofoblasto Tpbpa e citoqueratina-8, bem como para a detecção de GFP em combinação com os marcadores hematopoéticos e mesenquimais Runx1, vimentina, vWF e CD31 (Tabela 3.1). As análises foram feitas como descrito na seção 3.2.7.

Protocolo de imunofluorescência para GFP

As lâminas contendo os cortes congelados das áreas de enxerto e do baço foram fixadas em acetona por 15 min a -20°C. Em seguida, secaram em temperatura ambiente por mais 15 min e foram então lavados em PBS para remoção completa do OCT. Já os cortes parafinados foram desparafinados em três banhos de xilol por 10 min, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico por 5 min cada (três banhos de álcool 100%, um de 95% e um de 70%) e lavados em água destilada. Foi feita a recuperação antigênica por calor em citrato de sódio pH 6,0 (câmara Pascal ou micro-ondas).

Em seguida, foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando-se BSA 5%, ou BSA 5% com leite em pó dissolvido, por 1 h em temperatura ambiente. Após três lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-GFP em câmara úmida durante a noite por aproximadamente 14 h a 4°C. Nos controles negativos esta incubação foi feita com PBS. Após a lavagem em PBS, foi realizada uma segunda incubação de 1 h a 37°C com anticorpo secundário ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (A11039, Invitrogen). Após três lavagens em PBS, os cortes foram incubados com DAPI (1:10.000, Life Technologies) por 10 min e então montados com lamínula, utilizando meio de montagem Prolong Gold (P36934, Life Technologies).

Para as marcações duplas os anticorpos hematopoéticos e mesenquimais foram os primeiros a serem incubados em câmara úmida *overnight*. Após a lavagem

destes em PBS, foi realizada uma incubação de 1 h a 37°C com anticorpo secundário ligado a Alexa Fluor 546 (A11010, Invitrogen). Após a lavagem, foi realizada uma segunda incubação com o anticorpo anti-GFP por 1 h a 37°C. Após lavagem, uma terceira incubação de 1 h a 37°C com o anticorpo secundário de reconhecimento do anticorpo GFP ligado a Alexa Fluor 488. Os cortes foram lavados e então contra corados com DAPI (1:10.000, Life Technologies) e montados com lâminula, utilizando meio de montagem Prolong Gold (P36934, Life Technologies).

3.7 Microdissecção a laser

Para a técnica de microdissecção a laser foram utilizados diferentes sítios implantacionais de camundongos B6 fêmeas com 10.5 dg que acasalaram com machos B6 (n=1) ou Balbc-GFP (n=4). No dia da coleta, a bancada de dissecção e todos os instrumentos utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase (Termo Fisher Scientific). Após eutanásia das fêmeas grávidas por deslocamento cervical, foi realizada a laparotomia e dissecção dos sítios implantacionais conforme descrito anteriormente. Cada sítio implantacional foi lavado em PBS estéril pH 7,4 (10010-023, Life Technologies) e colocado em criomolde contendo OCT, sem clivagem. Em seguida, os blocos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer -80°C.

No dia da microdissecção, todo o material utilizado também foi tratado previamente com inibidor de RNase, incluindo o criostato CM1850 UV (Leica), as navalhas, a bancada e as cubas de coloração. Os tecidos congelados foram cortados até atingir a região de labirinto. A partir de então, foram feitos cortes seriados de 7 µm montados em lâminas de membrana de naftalato de polietileno (415190-9041-000, MembraneSlide 1.0 PEN, Zeiss) (Fig. 3.2-A). Foi preparada apenas uma lâmina por vez, a qual continha de cinco a sete cortes de sítios implantacionais. Cada lâmina foi, então, submetida ao protocolo rápido de imunohistoquímica para identificar as células hematopoéticas imaturas CD41⁺ da região de labirinto da placenta. Todos os reagentes da imunohistoquímica foram preparados a fresco, sendo diluídos no mesmo dia da microdissecção. Os reagentes, assim como os álcoois, foram diluídos em PBS estéril ou água livre de

nucleases. Além disso, eles também eram suplementados com inibidor de RNase (ThermoFisher Scientific) ou RNA later (Ambion).

Protocolo rápido de imunohistoquímica para microdissecção a laser

As lâminas foram mantidas a -20°C no interior do criostato por 1 min para aumentar a aderência do corte às lâminas de membrana. Os cortes de sítios implantacionais foram então fixados em álcool etílico 70% e depois lavados em água livre de nucleases por 45 seg cada. Os cortes foram incubados por 5 min com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10%, lavados e incubados por mais 5 min em BSA 5%. Após lavagem rápida em PBS estéril, adicionou-se aos cortes o anticorpo anti-CD41-biotina (133930, Biolegend) por 5 min, seguida de lavagem e incubação com ExtrAvidina Peroxidase (E2886, Sigma-Aldrich) por 2 min. A revelação do anticorpo foi feita com DAB (ab64238, Abcam) durante 3 min. Os cortes foram lavados em água destilada livre de nucleases (10977015, Life Technologies) e então corados por 15 seg em hematoxilina de Harris (26108-01, Electron Microscopy Sciences) previamente filtrada. Para finalizar, as lâminas foram imersas em cubas contendo álcool etílico 70%, 95% e 100% por 15 seg cada, seguida de secagem rápida.

A microdissecção a laser foi realizada no equipamento PALM® MicroBeam (Zeiss) da Queen's University através do programa PALM RoboSoftware. As células CD41⁺ foram identificadas e selecionadas no microscópio e em seguida, um feixe de laser ultravioleta foi direcionado ao redor das células de interesse, recortando-as. O raio estreito do laser garante que as células de interesse permaneçam intactas ao mesmo tempo que afasta o tecido adjacente indesejável (Bidarimath et al, 2015). As áreas de interesse foram então removidas por um pulso de laser para o tubo coletor. Foi utilizado tubo coletor com uma cobertura adesiva de silicone na tampa (415190-9201-000, Zeiss) que dispensa o uso de tampão (Fig. 3.2-B). Esta aquisição de células sem contato garante a pureza do material dissecado sem qualquer contaminação cruzada das células vizinhas (Bidarimath et al, 2015; Vandewoestyne et al, 2013). No final, 250µl de tampão RL do kit *Total RNA Purification* (Norgen Biotek Corp, Thorold) foram adicionados aos tubos coletores, que foram então homogeneizados em vórtex e armazenados em ultrafreezer -80°C com a tampa voltada para baixo.

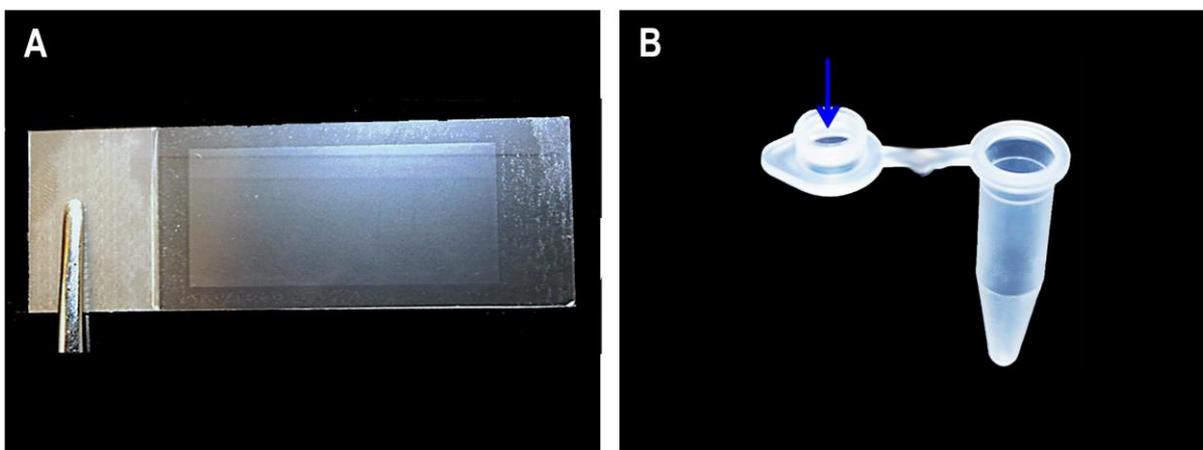


Figura 3.2. Instrumentos da microdissecção a laser. (A) Imagem da lâmina de membrana comercial 1.0 PEN, Zeiss. A membrana é feita de naftalato de polietileno (PEN) e auxilia o processo de catapulta preservando a morfologia do tecido e a recuperação de RNA. (B) Tubo coletor da Zeiss contendo uma cobertura adesiva de silicone na tampa (seta) que dispensa a utilização de líquidos para a captura das células durante o procedimento. Imagem adaptada de Bidarimath et al (2015).

3.8 Análise da expressão gênica do material microdissecado

3.8.1 Extração de RNA

A extração do RNA total após a coleta de células por microdissecção a laser foi feita com o kit *Total RNA Purification* (Norgen Biotek Corp). Para obter quantidade de RNA suficiente para realizar a análise de expressão gênica, foi feito um *pool* de 4-6 amostras. Os tubos coletores contendo os fragmentos de células microdissecadas em tampão RL foram retirados do ultrafreezer -80°C e colocados na estufa a 37°C por 45 min com a tampa voltada para baixo. Os tubos foram agitados algumas vezes em vórtex durante o período de incubação. Foram adicionados 250 μl de etanol absoluto (Biologia Molecular) em cada tubo e as amostras foram então adicionadas na coluna de separação e centrifugadas a 10.000 RPM por 2 min. O sobrenadante foi removido e 400 μl de solução de lavagem do kit foram adicionados à mesma coluna e centrifugado a 10.000 RPM por 2 min, repetindo este processo para otimizar a lavagem. O sobrenadante foi removido e a coluna de separação foi transferida para tubo Eppendorf de 1,7 mL. Foram adicionados 50 μL de solução de eluição do kit seguidos de centrifugação por 2 min a 200 RPM e de 1 min a 14.000 RPM, repetindo este passo para maximizar a coleta do RNA (resultando em dois tubos por amostra). A quantidade e qualidade do RNA total purificado foram aferidas em espectrofotômetro NanoDrop (Life Technologies). Foram usadas apenas amostras consideradas com alto grau de pureza com base

nas razões A260/280 e A260/230. Os tubos de RNA total purificados foram armazenados no ultrafreezer -80°C.

3.8.2 Obtenção de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total purificado utilizando o kit *First-strand cDNA synthesis* (27-9261-01, GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 20 µL. Primeiro, as concentrações de RNA das diferentes amostras foram diluídas com base na amostra com menor concentração de RNA (LCM 006-1 com 4,7 ng/ µL). Em seguida, 8 µL de RNA diluído foi adicionado à 7 µL de Master mix (1 µL notID primer, 1 µL dTT e 5 µL Bulk strand mix). Inicialmente, os tubos foram aquecidos a 65°C por 10 min e então resfriados em gelo. Para a reação final de síntese, a mistura foi incubada a 37°C durante 1 h. O cDNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a -80°C.

3.8.3 Expressão gênica por PCR em tempo real

- **Desenhos dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)**

Os iniciadores foram desenhados com o *Primer-BLAST* (*Primer3*, NCBI), disponível através do endereço: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, a partir da sequência de RNAm de referência (*RefSeq RNA*, NCBI) de *Mus musculus*. Durante esse processo, os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a flanquear ao menos um íntron e/ou estar sobre uma junção éxon-éxon sempre que possível. Além disso, os *primers* foram construídos de modo a amplificar todos os transcritos variantes, quando existentes. Outros fatores também foram personalizados, como: (i) tamanho do iniciador; (ii) tamanho do produto; (iii) temperatura de anelamento dos iniciadores; (iv) conteúdo GC do iniciador; (v) chance de pareamento entre o par de iniciadores e dentro do mesmo iniciador; e (vi) força de anelamento na extremidade 3' do iniciador. Por fim, os oligonucleotídeos foram analisados com a *OligoAnalyzer 3.1* (IDT, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para descartar aqueles favorecendo a formação de *hairpins*, homodímeros e heterodímeros, cujo *cutoff* adotado foi um $\Delta G \geq -9$ kcal/mole. A tabela 3.3 mostra os genes e as sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Nela, os três genes desenhados para normalizar os níveis dos genes estão destacados.

Tabela 3.3. Genes e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Os três últimos genes relacionados, aqui sombreados, foram desenhados como normalizadores.

Gene		Oligo sequence (5' - 3')	
Symbol	Entrez ID	Forward	Reverse
<i>Itga2b (CD41)</i>	16399	TGTGCTAAGCCTCAACGTGT	GGATGATCCGTGTCTGCTCC
<i>Cd93 (AA4.1)</i>	17064	ATCAGTACAGCCCAACACCAG	GAAGGTAGTGGCAGCTGTCT
<i>Ptpnc1 (Cd45)</i>	19264	GCTGAATACCAGAGACTTCCTTC	TGCTCATCTCCAGTTCATGCT
<i>Pecam1 (Cd31)</i>	18613	CACGCTGGTGTCTATGCAA	TTCGAGGTGGTGTGATGTC
<i>Vwf</i>	22371	CCATGTGTTACTGTGAAGATGGCT	GACACACCAGCTTGACCATG
<i>Runx1</i>	12394	AACGATGGCTTCAGACAGCA	CTCGTGTGGCATCTCTCAT
<i>Ly6a (Sca1)</i>	110454	GACTGGAGTGTACCAGTGCT	TGAGAATCCACAATAACTGCTGC
<i>Kit</i>	16590	TTCTGCACTCAACGGAGCC	TACGAGTCTATTCTTGGGATCTC
<i>Epo</i>	13856	GAATGGAGGTGGAAGAACAGGC	CAGGATGGCTTCTGAGAGCAG
<i>Epor</i>	13857	TCTGGTGTTCACTGCCAACAG	TCCAGGAGCACTACTTCATTGA
<i>Cdh5 (VE-Cad)</i>	12562	CAACCATGACAACACCGCCAA	CACGGTTAGCGTGTGGTTC
<i>Spi1 (Pu.1)</i>	20375	TCCATCGGATGACTTGGTACT	TCCCAGTAGTGATCGCTATGG
<i>Hbb-b1</i>	15129	CTTCAGGCTCCTGGGCAATAT	ATGCTCTCTTGGGAACAATTAACC
<i>Hbb-b2</i>	15130	AGAACTTCAGGCTCCTAGGC	GGGACATATAACCTTGTGCATAGA
<i>Hbb-y</i>	15135	TGGGAACCTGTCTCTGCTTC	CCAGCACATTACCCAAGAGTTTG
<i>Hbb-bh1</i>	15132	AGGAGAACTCTGGGAAGGCTC	AAGCCAAGGATGTCAGCAC
<i>Hba-x</i>	15126	TAGAGAGGCTCTTCTGCAGCT	CAACTGCTGAGACCCATGGT
<i>Hba-a1</i>	15122	CCGTCAACTTCAAGCTCCTGAG	GGCAGCTTAACGGTACTTGGA
<i>Hba-a2</i>	110257		
<i>Cdx2</i>	12591	TGCTGTAGCGGAATGTATG	GCTTGTTGGCTCGTTACAC
<i>Eomes</i>	13813	GCAGGGCAATAAGATGTACG	CTGAGTCTTGGAAAGTTCA
<i>Elf5</i>	13711	ATTCGCTCGCAAGGTTACTC	AAGCAACTGGAATCAGCATAGT
<i>Epcam</i>	17075	TGCTCCAAACTGGCGTCTA	GCTTTATCCTCCTCCAGACTT
<i>Gcm1</i>	14531	AGCAGTTTCAGCCTCCTGTC	CAAGTTTGCAGGTCTTCGTAGT
<i>Syna</i>	214292	CCCTTGTTCCTCTGCCTACTC	GCTGGGTTTGGATGGATAAG
<i>Ly6e</i>	17069	TGGCTTGCGAACCTTCAGCAGAT	TCCTGGCATGAACTGGCCACA
<i>Ctsq</i>	104002	AACTAAAGGCCCATGCTAC	CAATCCCCATCGTCTACCC
<i>Tp53</i>	21984	CGCAGTTGGATGCTGAACT	CGGAGGCACTCATTCTATGT
<i>Aldh1a3</i>	56847	GGGCAGACGGATAGGATATG	GCAAAGTCAGAGCTGGGTAAG
<i>Pcdh12</i>	53601	TGGCTGTGGCAGGAATCTAT	AAGACCCGAGTGCCTAAC
<i>Pr13d (Pl1)</i>	215028	CTGCTGACATTAAGGGCA	AACAAAGACCATGTGGGC
<i>Esrrb</i>	26380	CGCCATCAAATGCGAGTACATGC	GAATCACCATCCAGGCACTCTG
<i>Ehox</i>	57737	TTCGGTTTTCAACCTCAGGAA	TAACCTGAGCTTCTGAAGTCTCTCCTCTT
<i>Krt8</i>	16691	GGATGTGGACGAAGCATAACA	AGACTGCAACTCACGGATCTC
<i>Itga4</i>	16401	GCCTGGAGGAGAGGGATAAC	TGCCACAAGTCACGATAGA
<i>Vcam1</i>	22329	GAACCCAGGTGGAGGTCTACT	CCAGATGGTCAAAGGGATACAC
<i>Tfrc (Cd71)</i>	22042	GTTTCGTACAGCAGCGGAAGT	TCAATTCAACGTCATGGGTAAG
<i>Vim</i>	22352	CATTGAGATCGCCACCTACAG	GGTGTCAACCAGAGGAAGTGA
<i>Myb</i>	17863	TGCCAATTATCTCCCGAATCG	AACAGACCAACGTTTCGGACC
<i>Cd9</i>	12527	TGTTCTTCGGGTTCTCTTG	CACCTCATCTTGTGGGTATAG
<i>Kdr (Flk1)</i>	16542	TTTGCCAAATACAACCCTCAGA	GCAGAAGATACTGTACCACC
<i>Pgk1</i>	18655	CTGACTTTGGACAAGCTGGACG	GCAGCCTTGATCCTTTGGTTG
<i>Sdha</i>	66945	GCTCCTGCCTCTGTGGTTGA	AGCAACACCGATGAGCCTG
<i>Gapdh</i>	14433	GGGTCCAGCTTAGGTTTCAAT	CCCAATACGGCCAAATCCGT

- **Pré-amplificação do cDNA**

Uma vez que amostras provenientes de microdissecção comumente resultam em um baixo rendimento na extração de RNAm, foi necessária uma etapa de pré-amplificação do cDNA antes da qPCR (Li et al, 2008). Para isso, utilizamos o sistema *TaqMan® PreAmp Master Mix* (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante para uma reação final de 50 µL e 10 ciclos. O preparo do ensaio de pré-amplificação consistiu em 25 µl de TaqMan PreAmp Master Mix (2X), 12,5 µL da combinação dos *primers* utilizados para a qPCR (10 µM) e 12,5 µL de cDNA. A ciclagem empregada foi de: 10 min a 95 °C seguidos de 10 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60 °C por 4 min, em um termociclador (Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700). Após a pré-amplificação, o material resultante foi diluído cinco vezes (1:5) em água WFI.

- **Reação de qPCR**

Para a reação de qPCR, foi utilizado o reagente *Fast SYBR® Green Master Mix Real-Time PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções da fabricante. Para isso, 10 ng do cDNA pré-amplificado foram combinados com *Fast SYBR® Green Master Mix 2X* e 0,2 µM do par de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso) para um volume final de 10 µL. Para cada amostra, foram amplificados os genes de interesse e três genes de referência (Gapdh, Pgk1 e Sdh1) em duplicata. As reações foram conduzidas no *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) nas seguintes condições: 95 °C por 20 seg, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 seg, e 60 °C por 30 seg. No final da reação, incluiu-se uma etapa de determinação da curva de dissociação dos produtos de qPCR.

- **Análise dos dados de qPCR**

Após amplificação, as curvas de dissociação foram avaliadas no *software* do equipamento (*QuantStudio™ Software V1.3, ThermoFisher Scientific, USA*). Nessa etapa, excluiu-se as reações que apresentaram curvas que sugerissem amplificação de produtos inespecíficos ou formação de dímeros de *primers*. Em seguida, os

dados brutos foram exportados em formato .XLS. As eficiências médias de cada reação de qPCR foram calculadas no software LinRegPCR v. 2017 (Ruijter et al, 2009). Finalmente, os dados de expressão gênica normalizados foram calculados de acordo com o método proposto por Pfaffl (Pfaffl, 2001), levando-se em consideração a eficiência individual de cada reação. Os resultados foram organizados na forma de *heatmaps* representativos feitos no programa GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc.). Além do *heatmap* contendo a expressão relativa de todos os genes, os 40 genes de interesse foram ainda organizados em três grupos para traçar perfis gênicos relacionados à hematopoese, eritropoese e de origem embrionária. Os *heatmaps* de perfis foram organizados do gene mais expresso para o menos expresso, com exceção das hemoglobinas que ficaram agrupadas.

O perfil hematopoético teve genes agrupados por serem comumente expressos em células tronco e progenitores imaturos durante a vida embrionária (*VE-Cad, Cd31, AA4.1, Flk1, CD41, Sca1, c-Kit, Cd45, Vim*), contendo alguns genes exclusivos da linhagem hematopoética definitiva (*Runx1* e *PU.1*). Outros genes incluíram aqueles expressos em células tronco adultas (*Vwf*), além de *Epo* e *CD71*.

Os genes agrupados no perfil eritropoético foram aqueles expressos por células da linhagem eritroide em diferentes graus de maturação (*CD71, Epor, Epo*), nos quais alguns são prevalentes em células eritroides primitivas (*Cd9*) ou definitivas (*Myb*). Além disso, o perfil incluiu genes de hemoglobinas embrionárias (*Hba-x, Hbb-y, Hbb-bh1*) e adultas (*Hba-a1, Hbb-b1, Hbb-b2*).

O perfil de origem incluiu genes expressos em fases iniciais e tardias do desenvolvimento dos tecidos que formam a placenta. Estes foram genes expressos em tecidos mesenquimais (*Vim, Itga4, Flk1*), endotélio hemogênico (*VE-Cad, Cd31*) ou em células trofoblásticas (*Tpbpa, Pcdh12, CD71, Aldh1a3, Gcm1, Cdx2, Esrrb, Citoqueratina-8, Ly6e, Vcam1, Syna, Ehox, Epcam, CtsQ, Itga4, Elf5, Eomes*).

Cada gene foi analisado em duplicata. Apenas aqueles que se comportaram de forma semelhante entre as replicatas foram considerados amplificados. Além disso, foi utilizada a placenta inteira, sem microdissecção para confirmar a eficiência da reação das amostras microdissecadas e para validar os *primers*.

3.8.4 Reação de qPCR em amostras de placenta total como controle das análises de material microdissecado

- **Coleta das placentas**

Foram coletados sítios implantacionais de um camundongo SW fêmea com 10,5 dg para serem utilizadas como controle do material microdissecado. No dia da coleta, a bancada de dissecação e todos os instrumentos utilizados foram tratados com inibidor de RNase (RNase away, ThermoFisher Scientific). Após eutanásia das fêmeas grávidas foi realizada a laparotomia e dissecação dos sítios implantacionais conforme descrito anteriormente. Cada sítio implantacional foi lavado em PBS estéril pH 7,4 (10010-023, Life Technologies) e, então, a parede uterina foi removida, seguida da separação da placenta do feto e cordão umbilical. Individualmente, cada placenta foi macerada mecanicamente com ajuda de um bisturi e então colocada em Eppendorf contendo 1ml de TRIzol™ (ThermoFisher Scientific). Os Eppendorfs foram armazenados em ultrafreezer -70°C até o dia da extração.

- **Extração do RNA e obtenção do cDNA**

A extração do RNAm foi realizada com TRIzol™ (ThermoFisher Scientific) seguindo o protocolo do fabricante a partir de aproximadamente 60 mg de placenta adulta. Em seguida, o RNA foi quantificado por fluorimetria (Qubit, ThermoFisher Scientific) e analisado quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose desnaturante. Após seleção das amostras de qualidade, 1000 ng de RNA íntegro foi transcrito em cDNA com SuperScript™ VILO™ Master Mix (ThermoFisher Scientific), de acordo com recomendações da fabricante. Por fim, 10 ng de cDNA foram amplificados por reação de RT-PCR com o kit Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific), também de acordo com protocolo especificado pelo fabricante.

- **Reação de qPCR e análise dos dados**

A reação de qPCR foi a mesma do material microdissecado, nos quais foi utilizado o reagente *Fast SYBR® Green Master Mix Real-Time PCR Master Mix* (*ThermoFisher Scientific*) de acordo com as instruções da fabricante. A análise dos dados foi feita de forma semelhante ao material microdissecado utilizando o mesmo gene de referência para os cálculos. No final também foi gerado um *heatmap* representativo no programa GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc.).

4 RESULTADOS

As figuras apresentadas nessa seção foram orientadas de forma que a porção mesometrial do útero encontra-se à esquerda da página, enquanto a porção antimesometrial e o feto estariam localizados no lado direito se estivessem presentes na imagem. Algumas exceções foram indicadas na legenda.

4.1 A morfologia da placenta de camundongos

Sabe-se que o desenvolvimento dos sítios implantacionais não é sincrônico, mesmo entre fetos da mesma ninhada, mas as características principais da placenta são comuns às idades gestacionais e foram descritas a seguir. A maior parte da placenta de camundongos SW aos 9,5 dg consistiu na decídua materna (Fig. 4.1.1-A). As CTG formaram uma camada espessa de células em direção à decídua, ainda em processo de decidualização (Fig. 4.1.1-A, B, E). Enquanto isso, poucos vasos fetais e lagos de sangue materno se organizaram em meio a ilhas de trofoblasto no labirinto em formação (Fig. 4.1.1-C, E). Durante a morfogênese do labirinto, foi possível observar vasos sanguíneos da placa coriônica penetrando o labirinto envolvidos por células trofoblásticas (Fig. 4.1.1-D).

Aos 10,5 dg, a placenta de camundongos SW possuiu uma organização mais madura e foi possível distinguir as regiões principais: decídua basal, zona de junção, composta por uma camada de CTG e de espongiotrofoblasto, labirinto e placa coriônica (Fig. 4.1.2-A). A decídua apresentou-se um pouco menor do que na idade anterior e nela foi possível distinguir alguns vasos sanguíneos maternos. As CTG em contato direto com o tecido materno, formam agora uma monocamada de células grandes, com núcleos igualmente grandes, basofílicos e com nucléolos por vezes proeminentes (Fig. 4.1.2-A, B). Células espongiotrofoblásticas se organizaram em uma camada espessa de células compactas abaixo das CTG. Algumas células espongiotrofoblásticas eram vacuolizadas (Fig. 4.1.2-B).

O labirinto consistiu em canais de sangue materno e vasos sanguíneos fetais distribuídos entre cordões e ilhas de células trofoblásticas. Os canais de sangue materno continham hemácias anucleadas e não eram envolvidos por células

endoteliais, mas por células trofoblásticas gigantes. A maioria dos vasos sanguíneos fetais possuía endotélio visível e numerosos eritrócitos nucleados no lúmen. Em algumas regiões, a típica organização da membrana placentária que separa o sangue fetal e materno foi visível, sendo composta por células endoteliais fetais, sinciciotrofoblasto e células trofoblásticas (Fig. 4.1.2-C, D, E). A placa coriônica exibiu vasos sanguíneos largos em meio a tecido mesenquimal corioalantoico (Fig. 4.1.2-A). Foi possível observar os vasos sanguíneos da placa coriônica penetrando o trofoblasto do labirinto, como interdigitações (Fig. 4.1.2-A, B). No lado oposto, os vasos da placa coriônica se comunicavam com os largos vasos do cordão umbilical. Foi possível observar as vilosidades do saco vitelínico a partir da placa coriônica.

A placenta de camundongos B6 aos 10,5 dg apresentou características semelhantes aos camundongos SW dessa idade. Neles, também puderam ser observadas as regiões principais da placenta (Fig. 4.1.3-A). Uma monocamada de CTG se interpôs entre a decídua e uma camada espessa de células espongiotrofoblásticas (Fig. 4.1.3-A, B), assim como em camundongos SW. Vasos fetais penetravam no labirinto a partir da placa coriônica trazendo numerosos eritrócitos nucleados (Fig. 4.1.3-C). Ilhas de trofoblasto misturaram-se entre vasos sanguíneos fetais e canais de sangue materno menores (Fig. 4.1.3-D, E).

A placenta é funcionalmente madura aos 11,5 dg e apresentou pequenas diferenças em relação à placenta de camundongos SW aos 10,5 dg. A decídua e a camada de CTG estavam mais finas, enquanto a camada espongiotrofoblástica estava mais espessa (Fig. 4.1.4-A). No labirinto, os canais de sangue materno e os vasos fetais do labirinto eram mais numerosos e continham hemácias ou eritrócitos nucleados, respectivamente (Fig. 4.1.4-B, C, D, E).

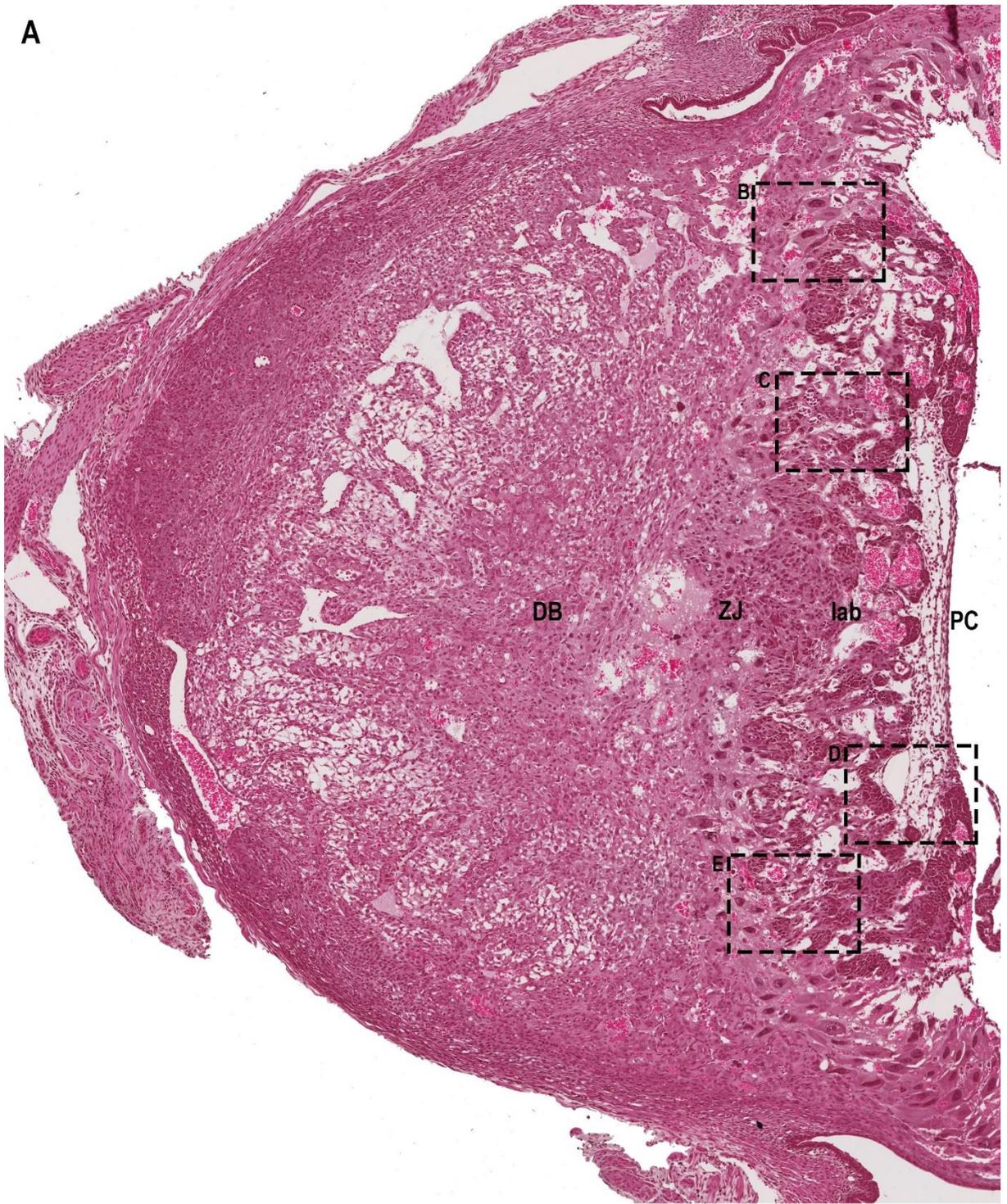
Aos 12,5 dg a decídua apresentou-se bastante reduzida. As CTG também se reduziram a uma fina camada nem sempre visível no corte (Fig. 4.1.5-A). A zona de junção era bastante espessa e além das CTG e células espongiotrofoblásticas, continha células glicogênicas que eram distinguidas pelo citoplasma altamente vacuolado. As células glicogênicas também foram encontradas na decídua. Projeções de células glicogênicas e espongiotrofoblásticas foram observadas no labirinto (Fig. 4.1.5-B, C, D). No labirinto, os canais de sangue materno e os vasos sanguíneos fetais eram bastante estreitos (Fig. 4.1.5-B, C, D, E). Na circulação fetal,

raras hemácias anucleadas foram observadas junto com os numerosos eritrócitos nucleados (Fig. 4.1.5-B, C, D, E).

Foram observadas pequenas variações morfológicas no grau de desenvolvimento das placentas de mesma idade gestacional, inclusive entre sítios implantacionais da mesma ninhada. Apenas as placentas com 10,5 dg e algumas com 11,5 dg pareceram ser importantes do ponto de vista hematopoético. Em comum, as placentas que tiveram arranjos hematopoéticos possuíam ilhas de trofoblasto entre os vasos sanguíneos na região de labirinto, e, quando as placentas mais maduras passaram a apresentar mais cordões de trofoblasto do que ilhas de células, tais arranjos hematopoéticos não foram mais encontrados. Nesse sentido, os resultados apresentados a seguir são referentes a placentas com 10,5 e 11,5 dg. As placentas com outras idades gestacionais foram utilizadas apenas pontualmente para ajudar a elucidar etapas da formação de células sanguíneas.

Apesar de os eritrócitos serem o tipo celular mais frequente na circulação fetal, outras células hematopoéticas de fenótipo mais imaturo foram encontradas. Estas células hematopoéticas eram heterogêneas entre si, apresentando diferenças no tamanho, arranjo nuclear, e na expressão de marcadores moleculares. Tais células hematopoéticas não-eritroides corresponderam a uma pequena população de células heterogêneas na circulação fetal aos 10,5 e 11,5 dg, sendo ainda mais raras nas demais idades gestacionais analisadas. Entretanto, alguns arranjos entre estas células se reproduziram entre diferentes sítios implantacionais de fêmeas diferentes e entre diferentes linhagens de camundongos, o que revelou padrões de formação hematopoética na placenta que foram descritos a seguir.

A



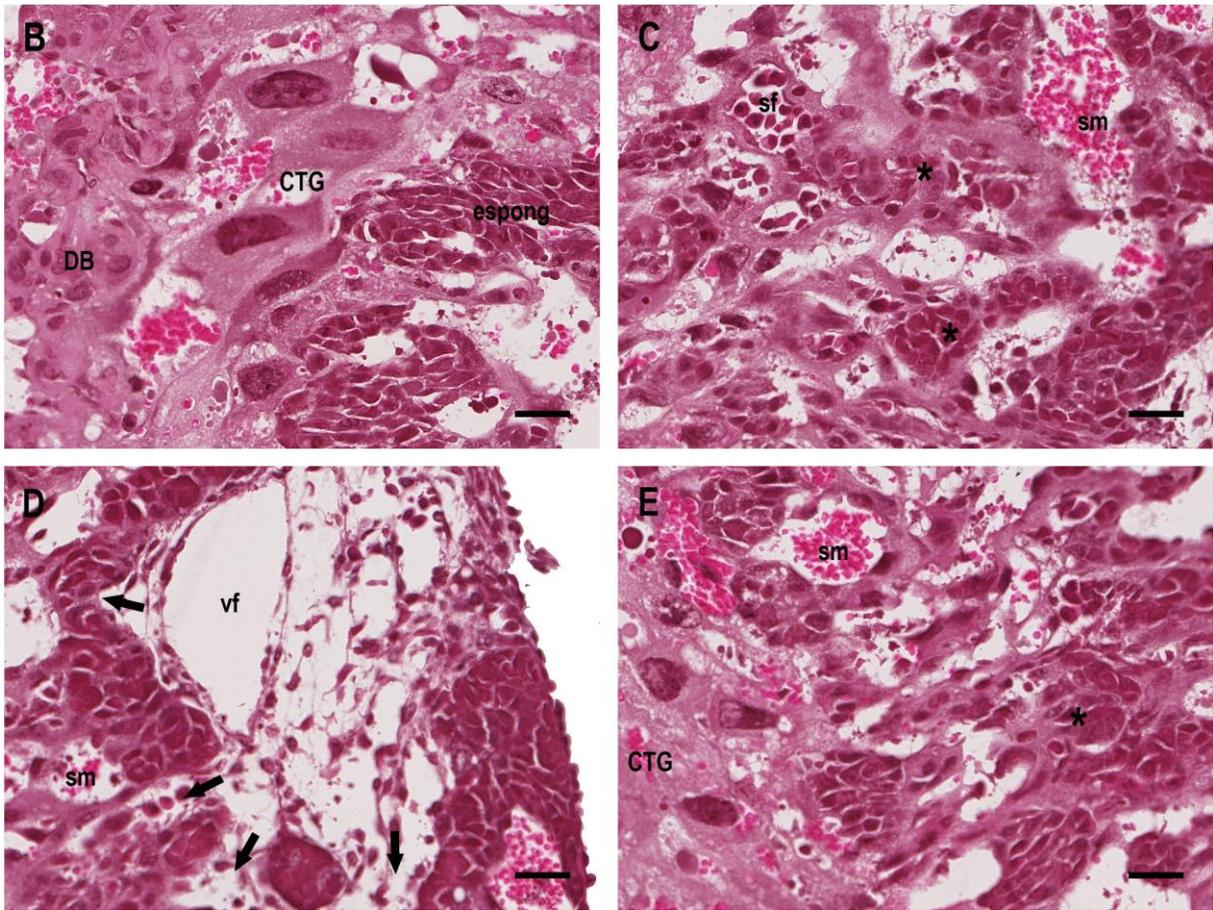
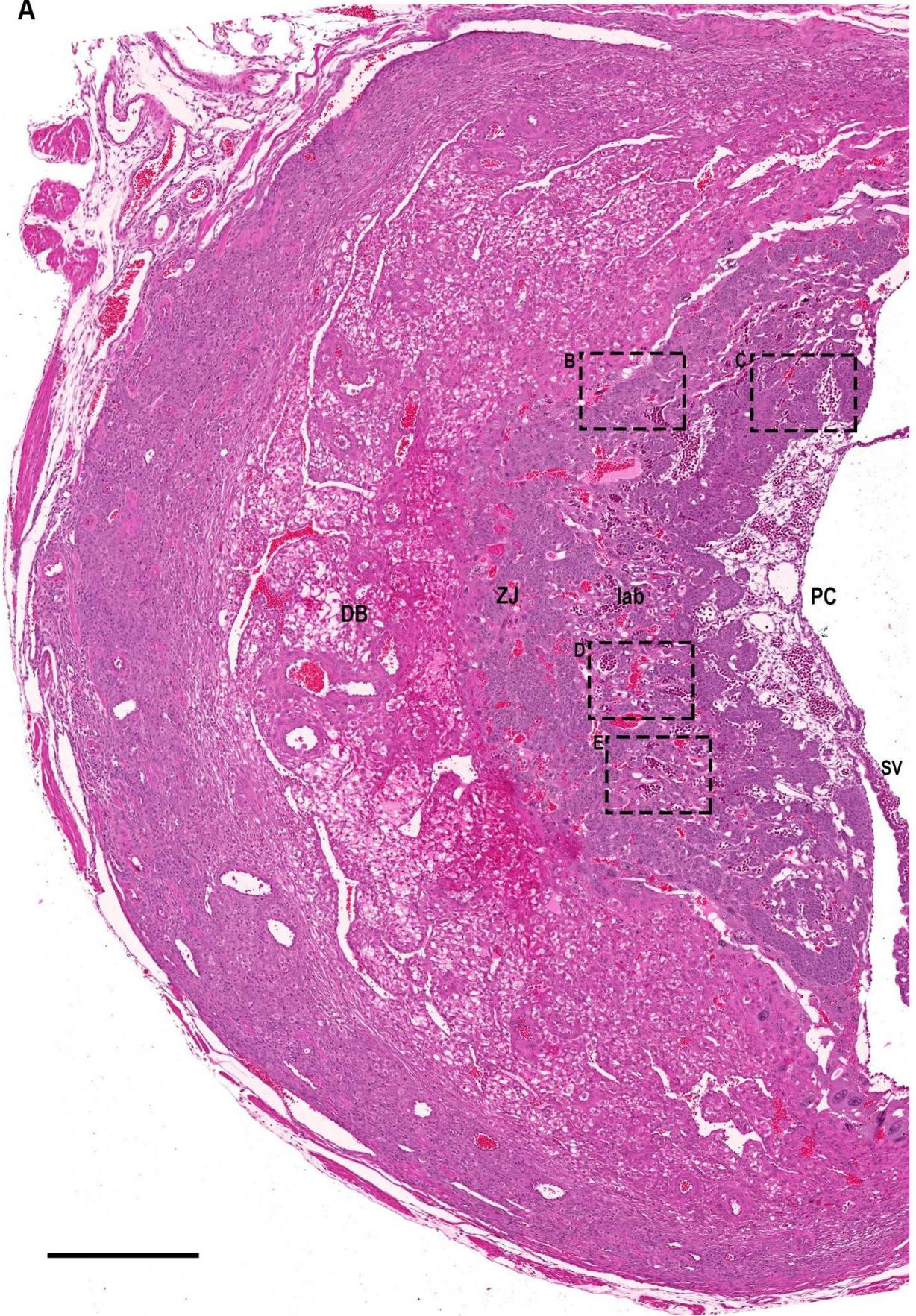


Figura 4.1.1. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 9,5 dg. (A) Imagem panorâmica representativa da placenta de camundongos SW aos 9,5 dg. A decídua basal (DB) ocupa a maior parte da placenta nessa idade. (B-E) Imagens em maior aumento da figura A. Células trofoblásticas gigantes (CTG) e espongiotrofoblasto (espong) em contato com a decídua basal (DB) para organizar a zona de junção (B). O labirinto ainda em processo de morfogênese contém vasos de sangue fetal (sf) e espaços largos de sangue materno (sm) em meio a numerosas ilhas de trofoblasto (C, E: *). Placa coriônica formada por mesênquima e alguns vasos fetais (vf) com invaginações para o interior do labirinto (seta) (D).

Figs. A-E: SW, 9,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 µm. Barra B-E= 30 µm.

A



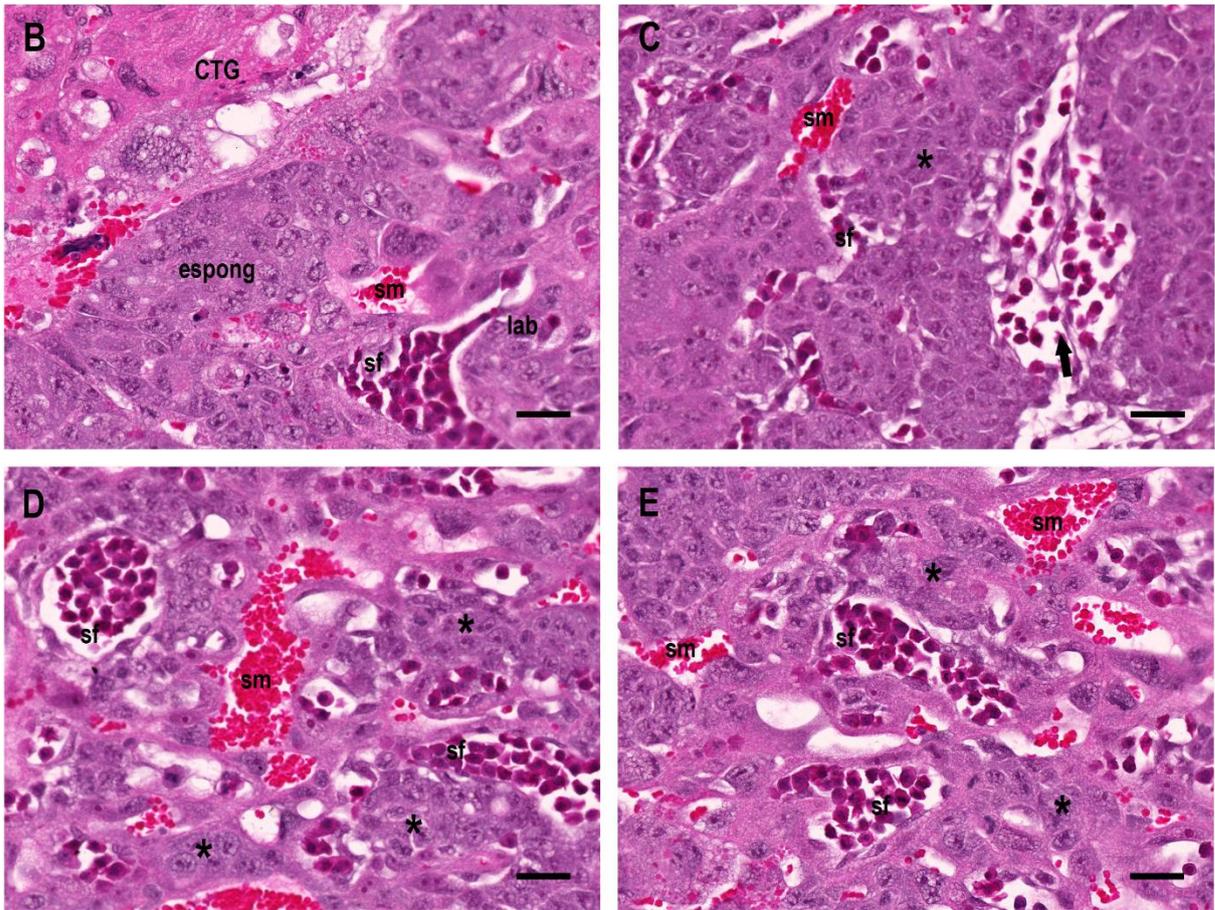
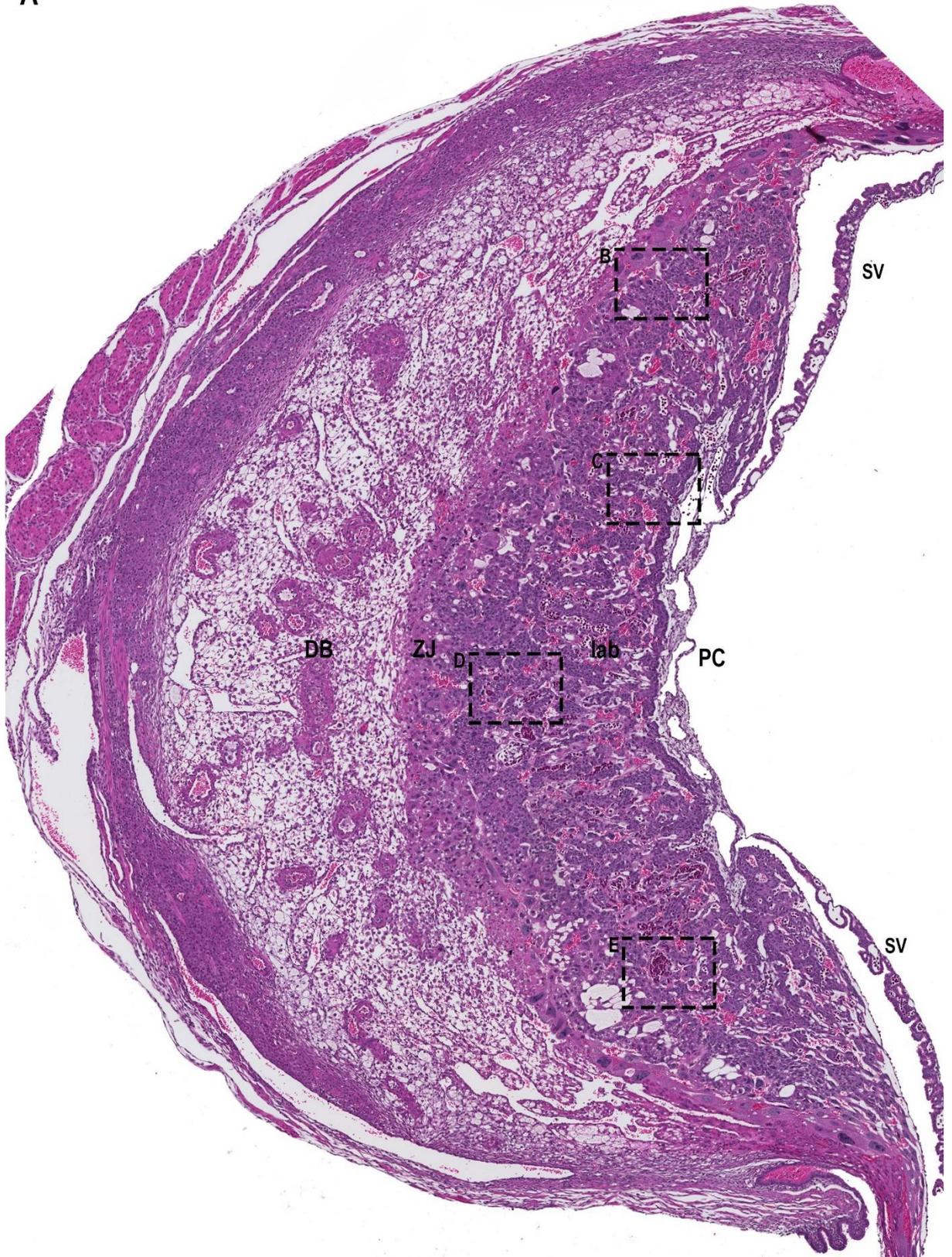


Figura 4.1.2. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 10,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos SW aos 10,5 dg. É possível distinguir as camadas básicas que formam a placenta: decídua basal (DB), zona de junção (ZJ) e labirinto (lab). A placa coriônica (PC) é composta por vasos sanguíneos grandes que ficam em tecido mesenquimal corioalantoico. Na imagem é possível observar uma parte do saco vitelínico (SV) próxima da placa coriônica. (B-E) Imagens em maior aumento da figura A. As células trofoblásticas gigantes (CTG) são células grandes, com núcleos igualmente grandes enquanto as células espongiotrofoblásticas (espong) são menores e compactas, às vezes com aspecto esponjoso (A). Interdigitação de um vaso sanguíneo da placa coriônica em direção ao labirinto (C: seta). O maior aumento da região de labirinto mostra canais de sangue materno (sm), compostos por hemácias pequenas e anucleadas, e vasos de sangue fetal (sf), contendo principalmente eritrócitos nucleados e de superfície irregular. Entre as duas circulações sanguíneas, estão cordões e ilhas de células trofoblásticas (B-E: *).

Figs. A-E: SW, 10,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 µm. Barra B-E= 30 µm.

A



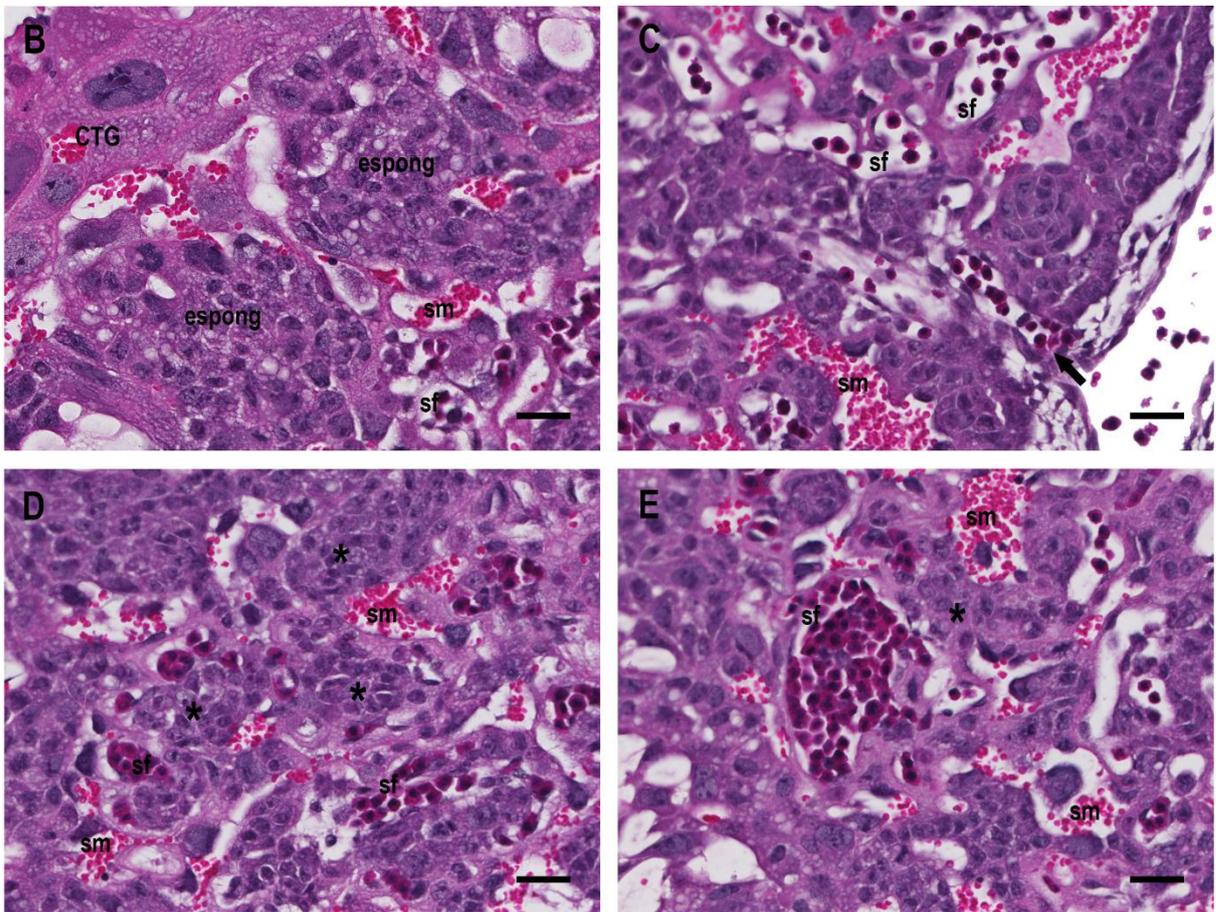
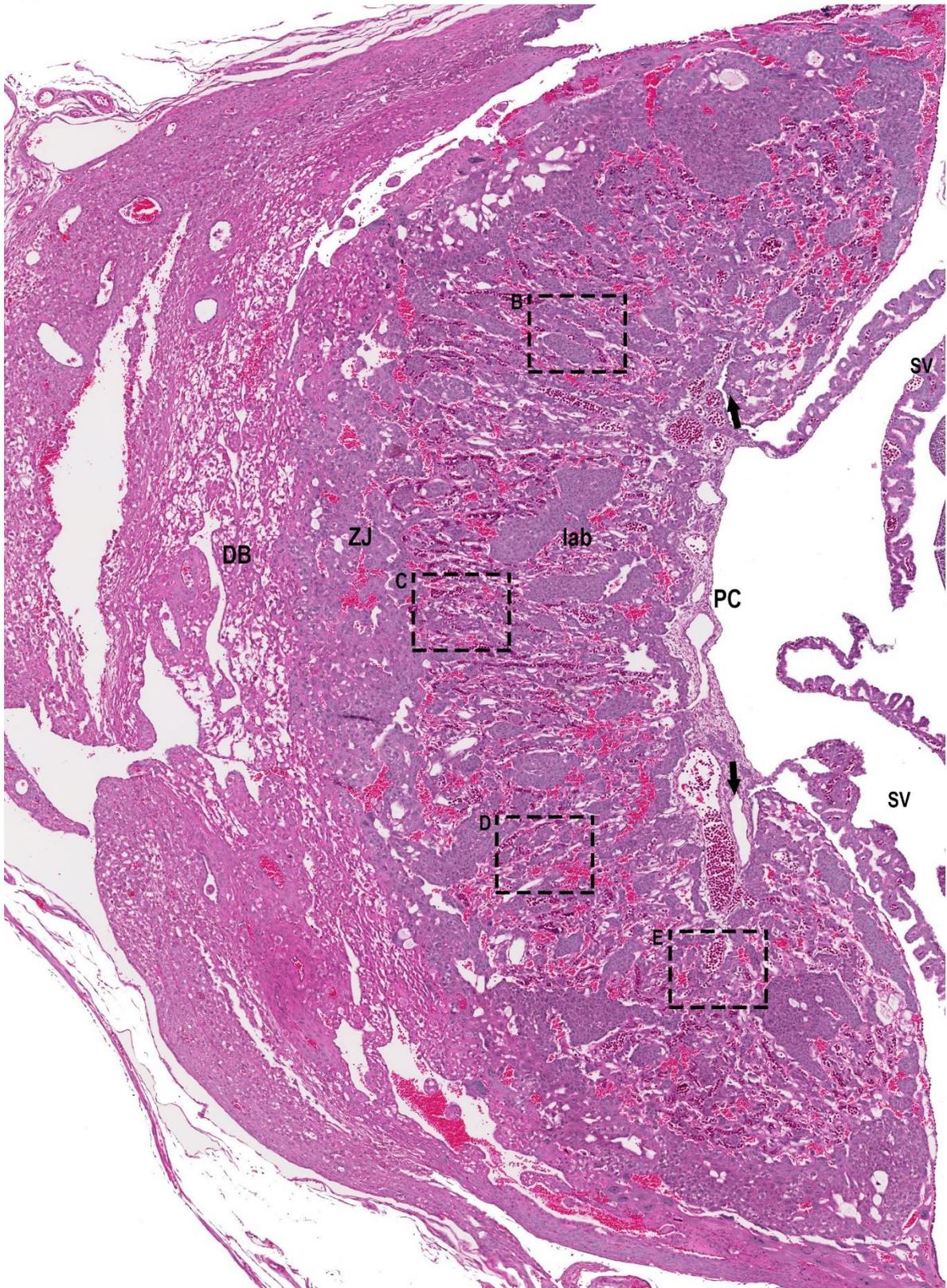


Figura 4.1.3. Placenta de camundongo C57BL/6 (B6) aos 10,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos B6 aos 10,5 dg. É possível distinguir as camadas de células que formam a placenta: decídua basal (DB), zona de junção (ZJ) e o labirinto (lab). A placa coriônica (PC) é composta por vasos sanguíneos grandes que ficam em tecido mesenquimal corioalantóico. Na imagem é possível observar uma parte do saco vitelínico (SV). (B-E) Detalhes das regiões da placenta mostram que as células trofoblásticas gigantes (CTG) são células grandes, com núcleos também grandes basofílicos e com nucléolos proeminentes. As células espongiotrofoblásticas (espong) são mais compactas e algumas têm aspecto esponjoso (A). Interdigitação de um vaso sanguíneo da placa coriônica em direção ao labirinto (C: seta). Na região de labirinto, canais de sangue materno (sm), contendo hemácias pequenas e anucleadas, e vasos contendo sangue fetal (sf), principalmente eritrócitos nucleados e de superfície irregular, estão separados por cordões e ilhas de células trofoblásticas (B-E: *).

Figs. A-E: B6, 10,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 µm. Barra B-E= 30 µm

A



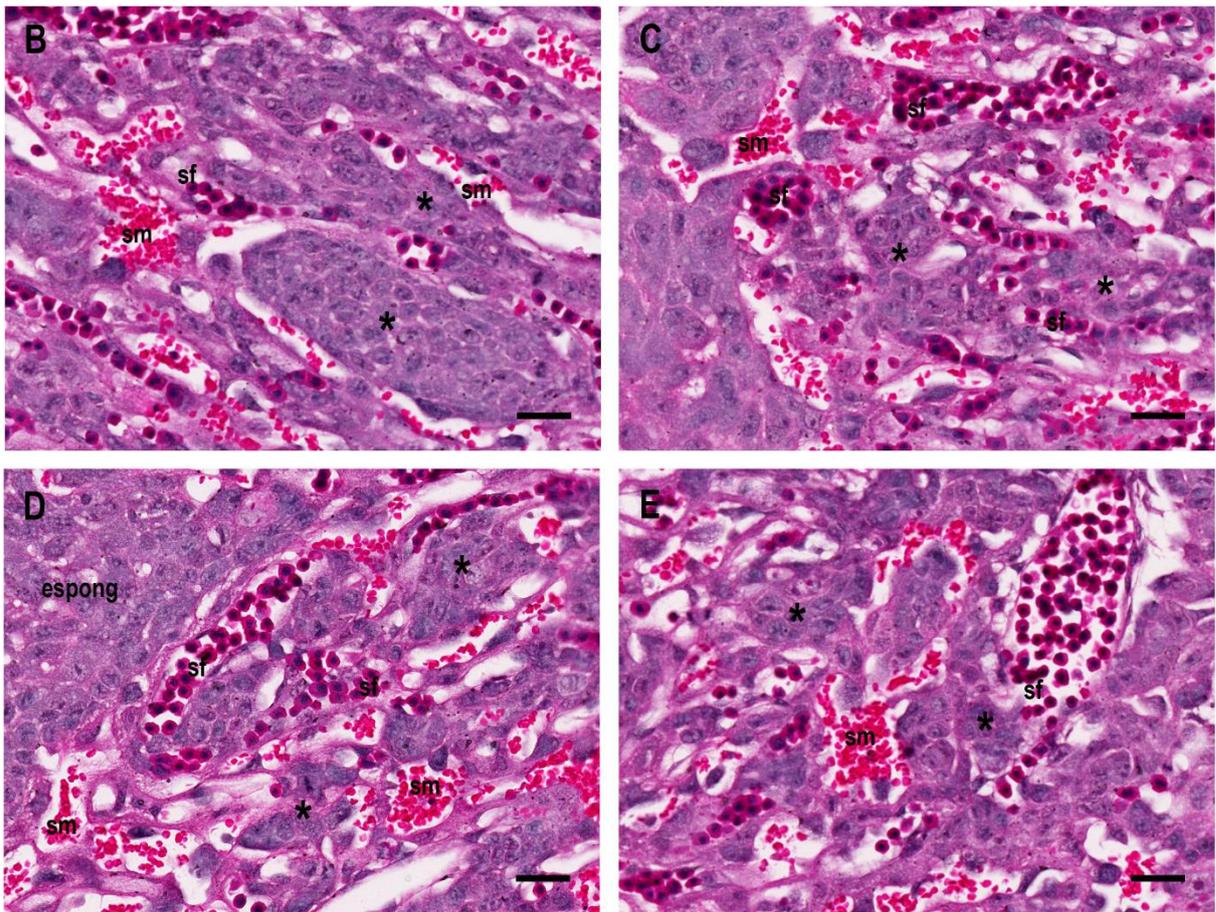
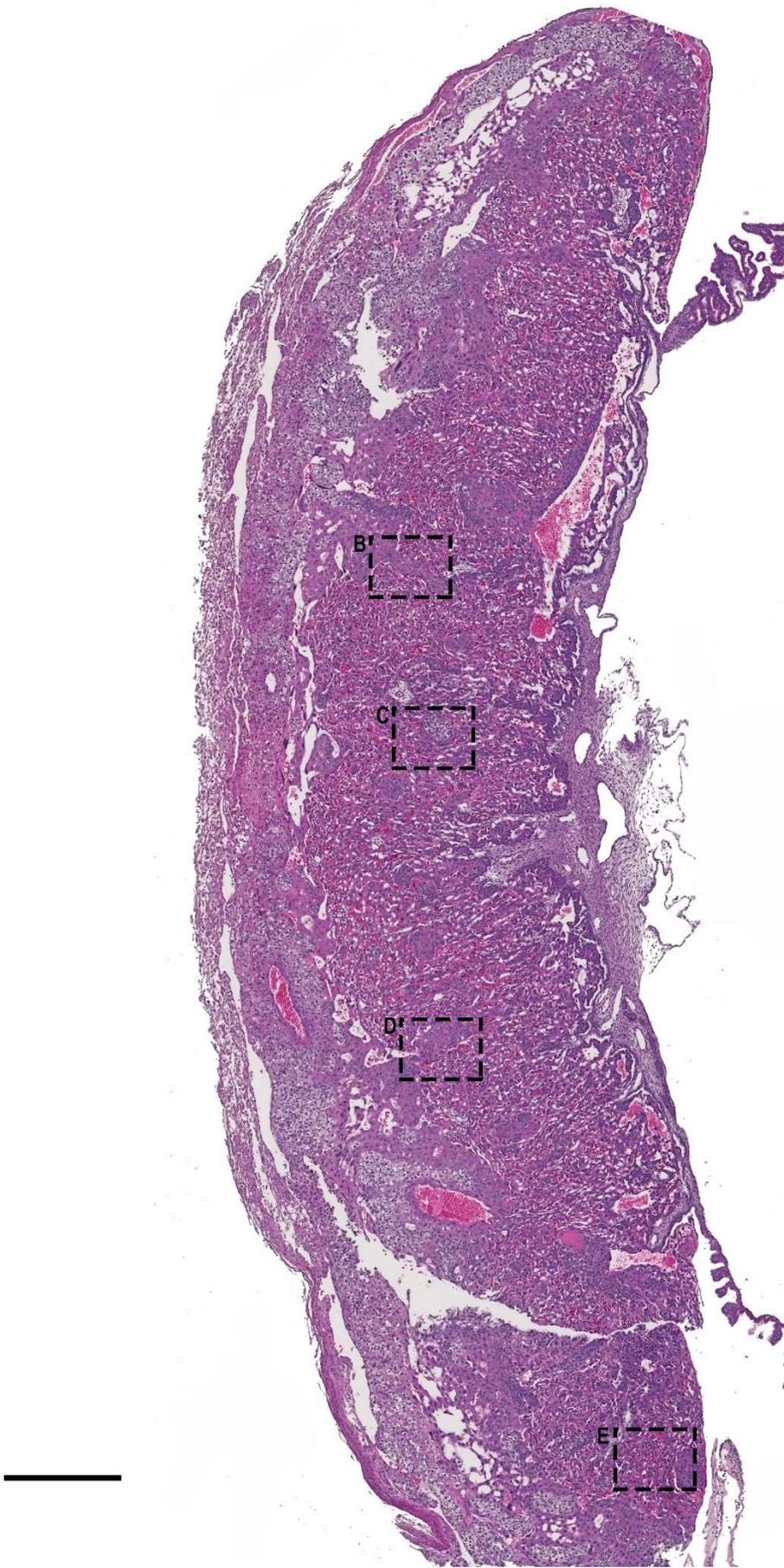


Figura 4.1.4. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 11,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos SW aos 11,5 dg. É possível distinguir as camadas de células que formam a placenta: decídua basal (DB), zona de junção (ZJ) e o labirinto (lab). A placa coriônica (PC) é composta por vasos sanguíneos grandes que ficam em tecido mesenquimal corioalantoico. Os vasos sanguíneos da placa coriônica contém interdigitações em direção ao labirinto (setas). Na imagem é possível observar uma parte do saco vitelínico (SV). (B-E) Detalhes da região do labirinto mostram canais de sangue materno (sm), com hemácias anucleadas, e vasos contendo sangue fetal (sf), ricos em eritrócitos nucleados e de superfície irregular. Entre as duas circulações sanguíneas, estão cordões e ilhas de células trofoblásticas (*).

Figs. A-E: SW, 11,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 µm. Barra B-E= 30 µm.

A



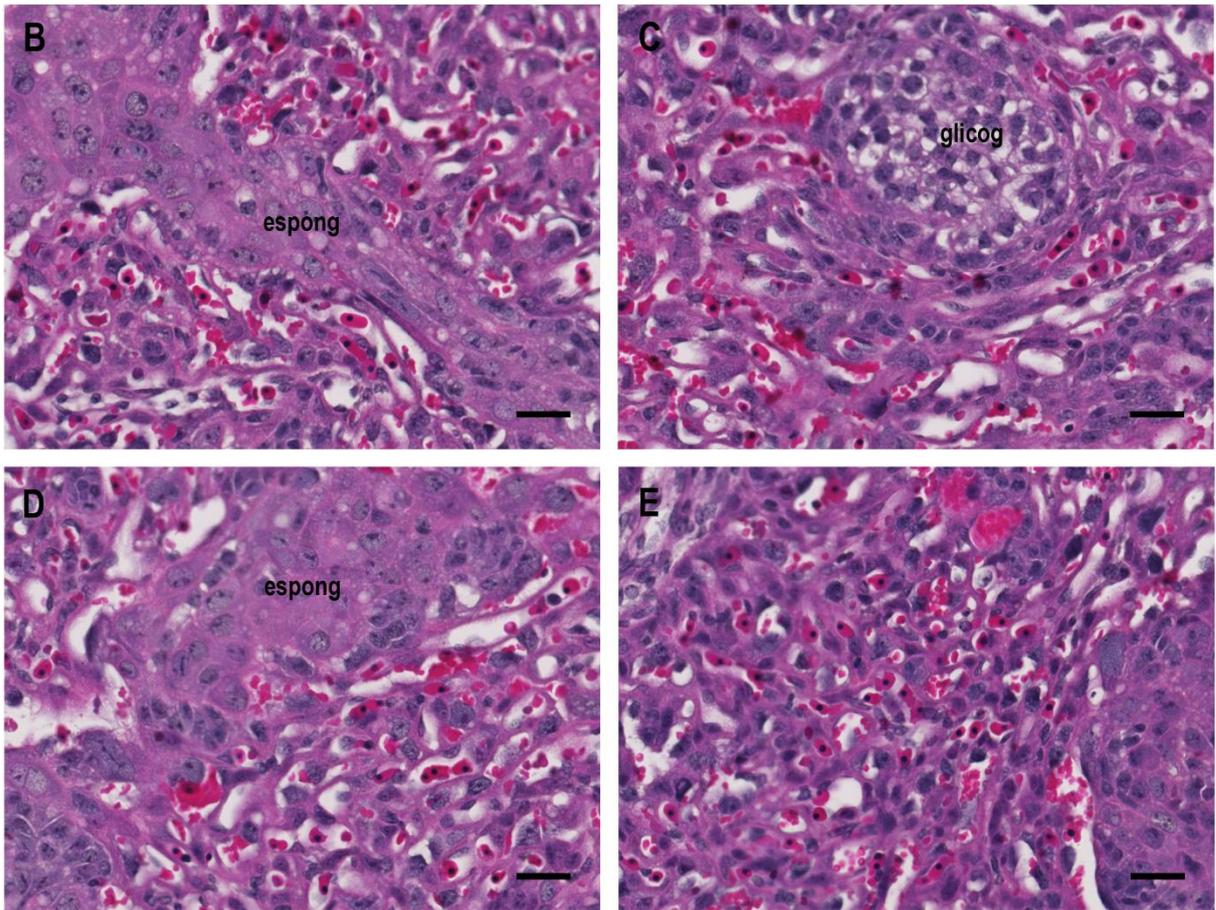


Figura 4.1.5. Placenta de camundongo Swiss Webster (SW) aos 12,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos SW aos 12,5 dg mostra que o labirinto nessa idade ocupa a maior parte da placenta. (B-E) Imagens em maior aumento da figura A. Projeções da camada espongiotrofoblástica (espong) são observadas em direção ao labirinto (B). Ilhas de células glicogênicas (glicog) e de espongiotrofoblasto são observadas no labirinto (C-D). Os canais de sangue materno e fetal são estreitos e numerosos (E). O sangue fetal ainda contém abundância de eritrócitos nucleados.

Figs. A-E: SW, 12,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 μ m. Barra B-E= 30 μ m.

4.2 Imunofluorescência da placenta murina na metade da gestação (10,5 e 11,5 dias gestacionais)

Para descrever as células sanguíneas da placenta foi necessário identificar o nicho placentário aos 10,5 e 11,5 dg. Os anticorpos mais utilizados para detectar antígenos expressos em células trofoblásticas e endoteliais da placenta de camundongos estão indicados nas figuras 4.2.1 e 4.2.2. As citoqueratinas compõem filamentos intermediários do citoesqueleto de células epiteliais. Em camundongos, a citoqueratina-8 é encontrada nas células epiteliais e glandulares do útero não-grávido, e durante a gestação é expressa de forma específica nas células trofoblásticas. Na figura 4.2.1 foi possível observar a presença deste filamento em todas as células trofoblásticas do labirinto, espongiotrofoblasto e CTG (Fig. 4.2.1-A). Foi observado um padrão fibrilar de distribuição da citoqueratina-8 em toda a extensão destas células, mas principalmente próximo à membrana plasmática (Fig. 4.2.1-A, B). Essa marcação foi mais intensa nas CTG e nas duas camadas de sinciotrofoblasto, e menos intensa nas ilhas de trofoblasto da região do labirinto e células sinciotrofoblásticas (Fig. 4.2.1-B). Células da placa coriônica e células presentes na circulação materna e fetal foram negativas para o anticorpo. As células na decídua também foram negativas para citoqueratina-8, exceto pela presença de raras células trofoblásticas responsáveis pelo processo de decidualização (Fig. 4.2.1-A).

A proteína Tpbpa estava presente nas células espongiotrofoblásticas da zona de junção (Fig. 4.2.1-C, D, E) e em algumas células espongiotrofoblásticas no labirinto (Fig. 4.2.1-D). As células positivas expressaram Tpbpa de forma puntiforme no citoplasma, em diferentes intensidades entre as células (Fig. 4.2.1-C, E). Diferenças no tamanho e disposição nuclear também foram observadas entre as células espongiotrofoblásticas Tpbpa positivas. Foi possível observar células grandes e pequenas, com núcleos de diferentes tamanhos, às vezes bilobado e/ou dois núcleos por célula (Fig. 4.2.1-C, D, E). A dupla marcação de citoqueratina-8 com Tpbpa evidenciou a padrão puntiforme de Tpbpa com o padrão fibrilar da citoqueratina nas células espongiotrofoblásticas (Fig. 4.2.1-E).

A vimentina compõe um filamento intermediário expresso em células de origem mesenquimal, incluindo endotélio. O anticorpo contra vimentina marcou fortemente as células endoteliais uterinas e células endoteliais do feto, incluindo os

vasos fetais da placenta (Fig. 4.2.2-A, B, C, D). Foi possível notar a ausência de vasos sanguíneos na zona de junção (Fig. 4.2.2-A). Também foi observada a ausência de endotélio nos espaços de sangue maternos do labirinto, os quais eram envolvidos por CTG sinusoidais que expressavam citoqueratina-8 (Fig. 4.2.2-B). A positividade do endotélio fetal da região do labirinto (Fig. 4.2.2-B) e da placa coriônica (Fig. 4.2.2-C) evidenciou a ampla vascularização dessa região. O CD31 foi outro marcador endotelial presente nas células endoteliais dos vasos fetais do labirinto (Fig. 4.2.2-D) e da placa coriônica (Fig. 4.2.2-E), bem como outros vasos embrionários e vasos maternos da decídua. Diferente da vimentina, a expressão desta proteína tinha um padrão puntiforme como observado em células duplo-positivas (Fig. 4.2.2-D), às vezes dando a impressão de descontinuidade entre as células, se observado em apenas um plano focal (Fig. 4.2.2-E).

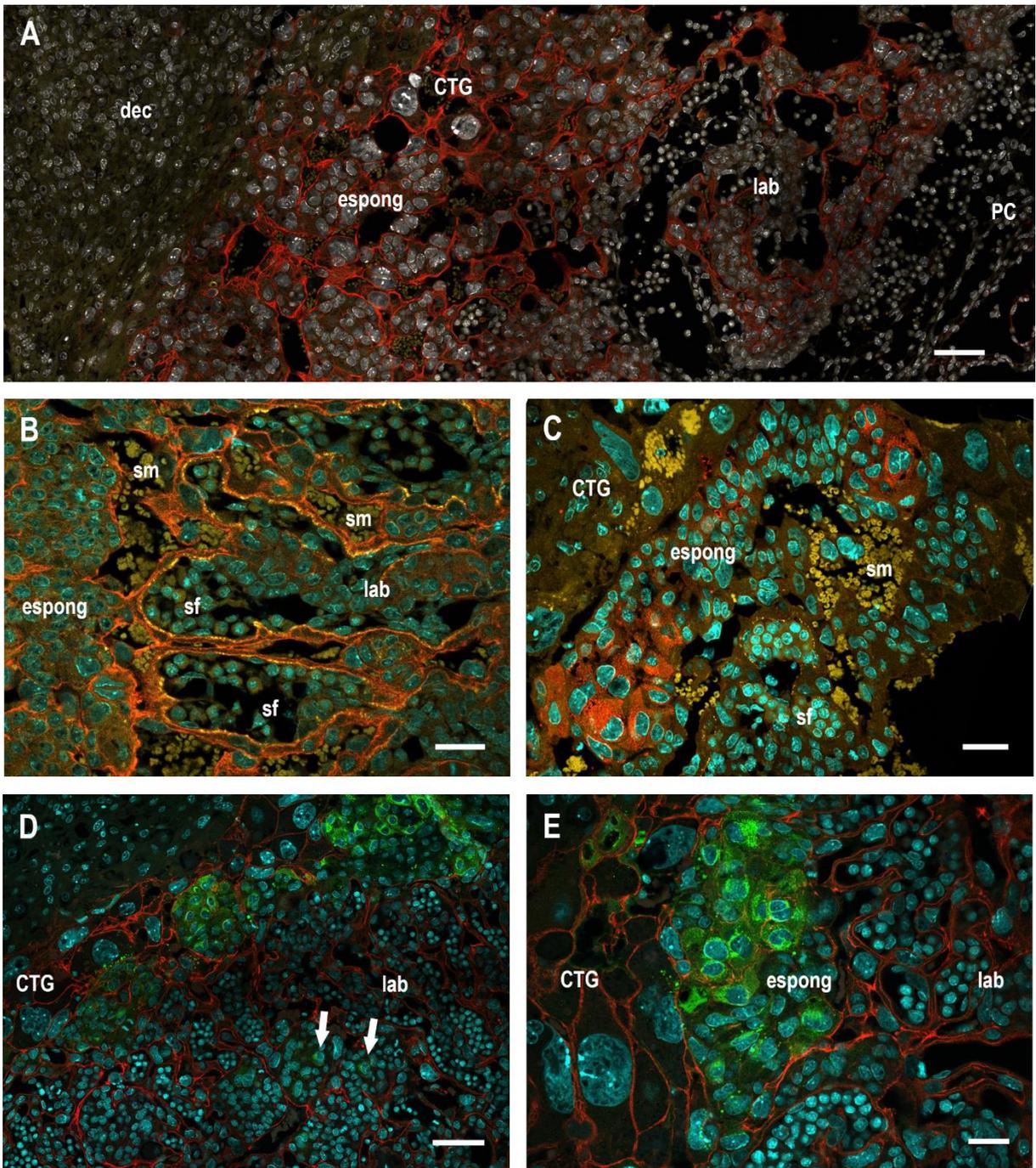


Figura 4.2.1. Identificação de células trofoblásticas da placenta de camundongos aos 10,5 dg. (A) Imagem da placenta de camundongos mostrando a presença de citoqueratina-8 em todas as células trofoblásticas do labirinto (lab), espongiotrofoblasto (espong) e células trofoblásticas (CTG), enquanto o mesênquima da placa coriônica (PC) e a decídua não expressam esse filamento. (B) A distribuição fibrilar de citoqueratina-8 pode ser observada no citoplasma, principalmente na região periférica da célula. Células do sangue materno (sm) e fetal (sf) não expressam citoqueratina-8. (C) A proteína Tpbpa é detectada em quantidades variáveis nas células espongiotrofoblásticas da zona de junção, mas não em células trofoblásticas do labirinto ou CTG. (D) Algumas células Tpbpa⁺ foram observadas no labirinto (setas). (E) Heterogeneidade nuclear e de expressão citoplasmática de citoqueratina-8 e Tpbpa nas células espongiotrofoblásticas.

Fig. A: B6, 10,5 dg; Vermelho: Troma TRITC, Branco: DAPI. **Fig. B:** SW, 10,5 dg; Vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Fig. C:** SW, 10,5 dg; Vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Figs. D, E:** SW, 10,5 dg; Vermelho: Troma TRITC, Verde: Tpbpa Alexa Fluor 488, ciano: DAPI. **Figs. A-E:** Confocal LSM 710. Barra A= 70 µm; B-E= 30 µm.

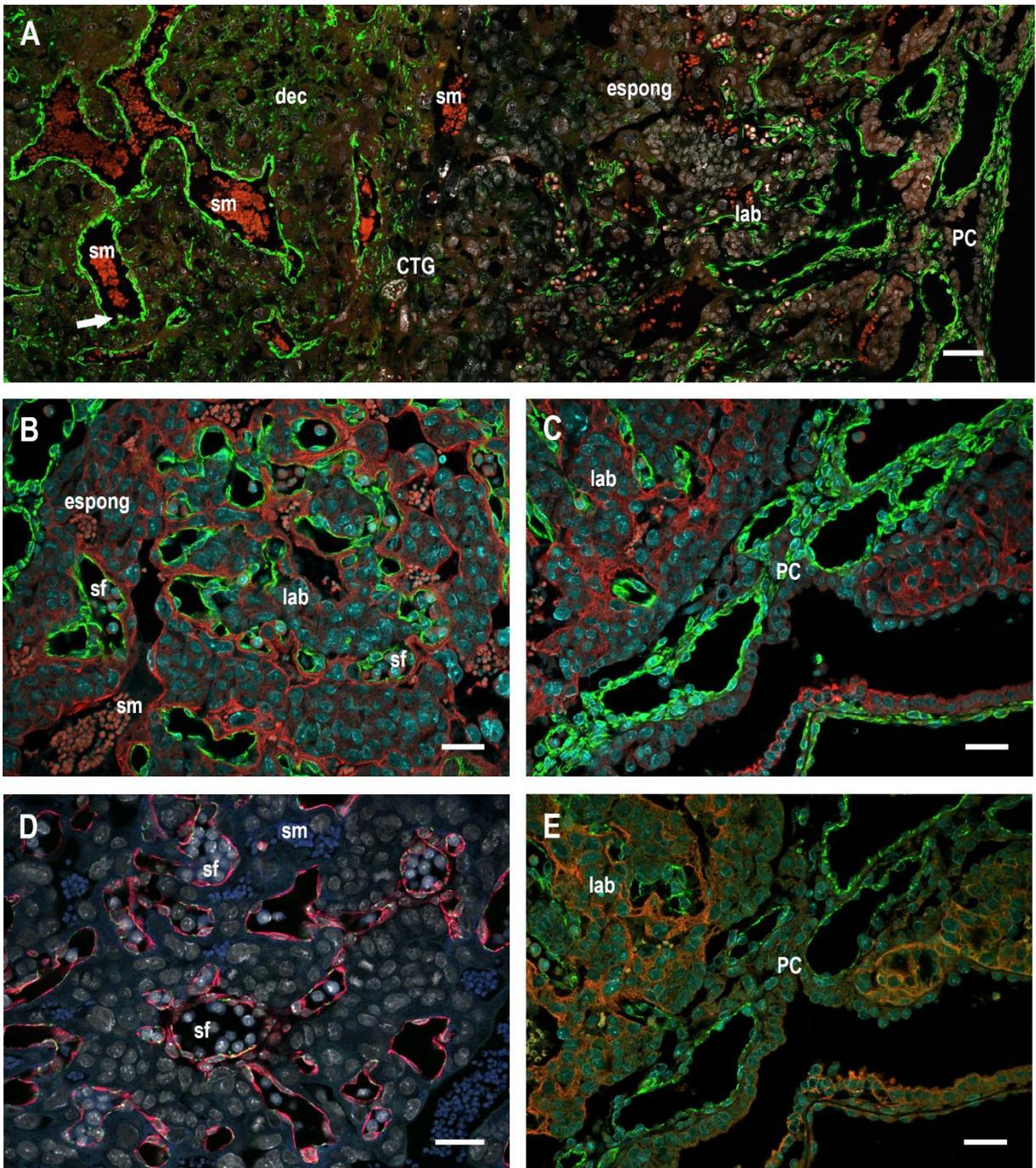


Figura 4.2.2. Detecção de células endoteliais na placenta de camundongos. (A) Na imagem das regiões da placenta de camundongos é possível observar a distribuição de vimentina em células mesenquimais da placa coriônica (PC), nos vasos fetais do labirinto (lab) e da PC, alguns vasos maternos na decídua (dec) e algumas células deciduais. (B) Expressão de vimentina nas células endoteliais dos vasos que contém sangue fetal (sf). O sangue materno (sm) é envolvido por células que expressam citoqueratina-8 e não vimentina. (C) O endotélio da placa coriônica é fortemente positivo para vimentina. (D) Células endoteliais dos vasos fetais do labirinto expressam vimentina e CD31. (E) Padrão puntiforme da proteína CD31 nos vasos sanguíneos da placa coriônica e o labirinto. CTG: Células trofoblásticas gigantes.

Fig. A: SW, 11,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. B, C:** B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Fig. D:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. E:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Figs. A-E:** Confocal LSM 710. Barra A= 70 µm; B-E= 30 µm.

4.3 Hematopoese em vasos fetais do labirinto próximos à placa coriônica

Foram observadas raras projeções intraluminais de *clusters* de células hematopoéticas imaturas a partir do endotélio dos vasos sanguíneos da placa coriônica e de vasos fetais da porção do labirinto próxima a essa região (Fig. 4.3.1-A, B). As células que compunham estes *clusters* eram morfológicamente semelhantes entre si, apresentando-se pequenas, redondas e com o citoplasma moderadamente basofílico. Os núcleos ocupavam a maior parte das células e eram esféricos e fortemente basofílicos. Estas células que compunham o *cluster* pareciam estar aderidas umas às outras e também ao endotélio do vaso fetal de onde se projetavam (Fig. 4.3.1-A, B). Grupos de células com fenótipo semelhante foram observadas circulando em vasos fetais próximos a estes arranjos (Fig. 4.3.1-C, D). Células semelhantes também foram observadas circulando sozinhas ou em poucas células nos vasos fetais em toda a extensão do labirinto (Fig. 4.3.1-E, F).

A imunofluorescência em *Whole Mount* da placenta aos 10,5 dg revelou células endoteliais positivas para o anticorpo CD31 (Fig. 4.3.2-B, C). Além disso, *clusters* semelhantes àqueles identificados próximos à placa coriônica na microscopia de campo claro também foram identificados pelo anticorpo anti-CD41 (progenitores hematopoéticos embrionários) aderidos ao endotélio fetal (Fig. 4.3.2-A, C). Pela técnica de imunofluorescência convencional, células livres na circulação, de morfologia similar às células dos clusters, também foram positivas para o marcador hematopoético CD41 (Fig. 4.3.3-A, B), bem como para outro marcador clássico de células-tronco, o c-Kit. O anticorpo contra essa segunda proteína revelou uma marcação puntiforme em todo citoplasma das células positivas (Fig. 4.3.3-C, D, E, F). Algumas células endoteliais de vasos fetais da placa coriônica também foram positivas para esse marcador (Fig. 4.3.3-D). Foi possível observar a presença de células c-Kit positivas em um vaso que chegava da placa coriônica e penetrava o labirinto, nos quais algumas células endoteliais também foram positivas para este marcador (Fig. 4.3.3-E, F).

O Runx1, um marcador de progenitores hematopoéticos da linhagem definitiva, estava presente em pelo menos algumas das células imaturas que circulavam nos vasos da placenta (Fig. 4.3.4-A). A vimentina, além de marcar fortemente as células endoteliais dos vasos fetais da placenta, também marcou de forma reticular o citoplasma de algumas células circulantes, revelando uma origem

mesenquimal (Fig. 4.3.4-B). Além destes marcadores hematopoéticos convencionais, as células circulantes de morfologia semelhante aos *clusters* da placa coriônica e vasos próximos, expressaram fortemente o fator de von Willebrand (vWF). Este fator, originalmente expresso em células endoteliais e megacariócitos, exibiu uma marcação puntiforme típica (Fig. 4.3.4-C, D, E). Mas, este não foi encontrado em células endoteliais dos vasos sanguíneos fetais do labirinto, com exceção de algumas células endoteliais de vasos presentes na placa coriônica (Fig. 4.3.4-F).

Células circulantes morfologicamente semelhantes às células que compunham os *clusters* próximos à placa coriônica exibiram pelo menos um dos marcadores de progenitores hematopoéticos clássicos CD41, c-Kit, Runx-1, ou vimentina, e também foram positivas para o vWF. Ainda, o uso do marcador nuclear DAPI e da imunofluorescência com confocal permitiram distinguir a presença de um ou dois nucléolos na maioria das células hematopoéticas positivas (Fig. 4.3.3-A-F e 4.3.4-B-F).

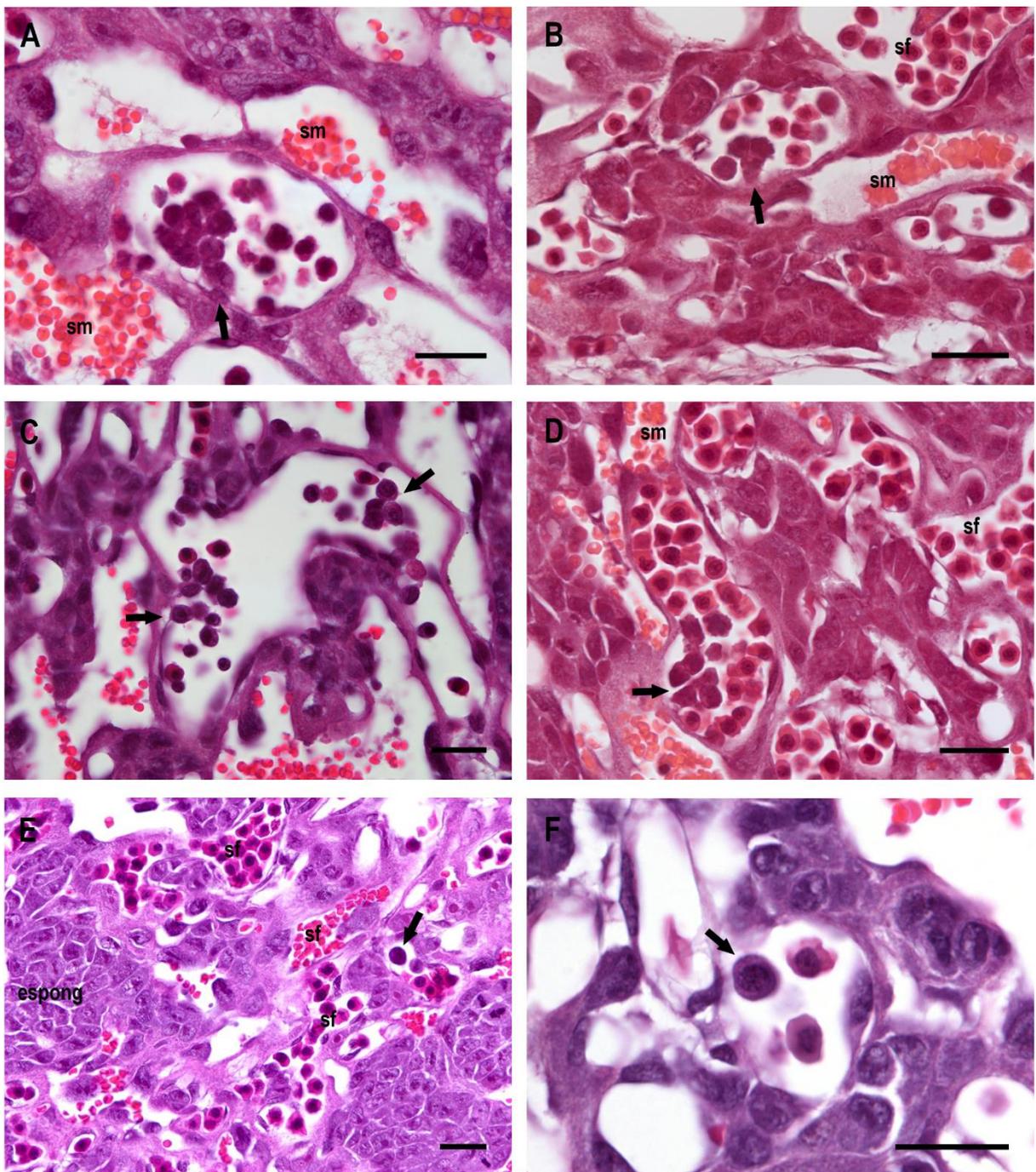


Figura 4.3.1. Brotamentos intraluminais de *clusters* de células hematopoéticas imaturas. (A, B) Alguns vasos fetais do labirinto exibem brotamentos de células hematopoéticas a partir de projeções intraluminais do endotélio (seta). As células dos *clusters* estão aparentemente aderidas umas às outras e são morfológicamente semelhantes entre si: redondas e pequenas, com núcleo grande e basofílico. **(C, D)** Grupos de células fenotipicamente semelhantes às células dos *clusters* são encontradas no interior dos vasos fetais (seta) ou **(E, F)** como células únicas em meio aos eritrócitos nucleados (seta). sm: sangue materno; sf: sangue fetal; espon: espongiotrofoblasto.

Figs. A, C: B6, 10,5 dg; HE. **Figs. B, D-F:** SW, 10,5 dg; HE. Barra= 20 µm.

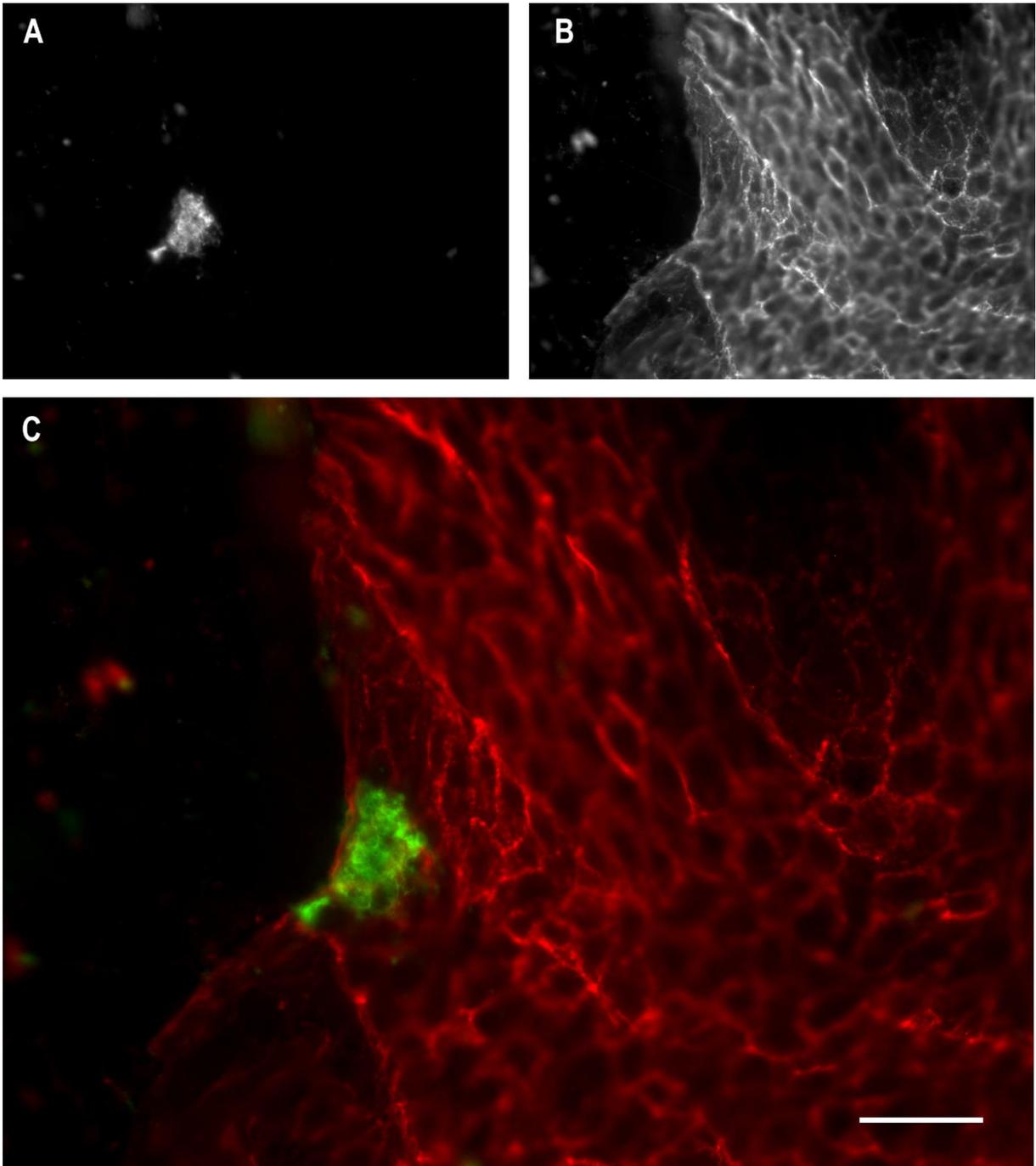


Figura 4.3.2. Imunofluorescência em *Whole Mount* dos brotamentos hematopoéticos intraluminais. (A-B) Brotamentos intraluminais de *clusters* de células hematopoéticas imaturas CD41⁺ (verde) em vaso fetal CD31⁺ (vermelho).

Fig. A - C: B6, 10,5 dg. A: FITC, B: PE, C: Verde CD41 FITC, vermelho: CD31 PE. Microscópio de fluorescência Axiovert M1. Barra= 30 μ m.

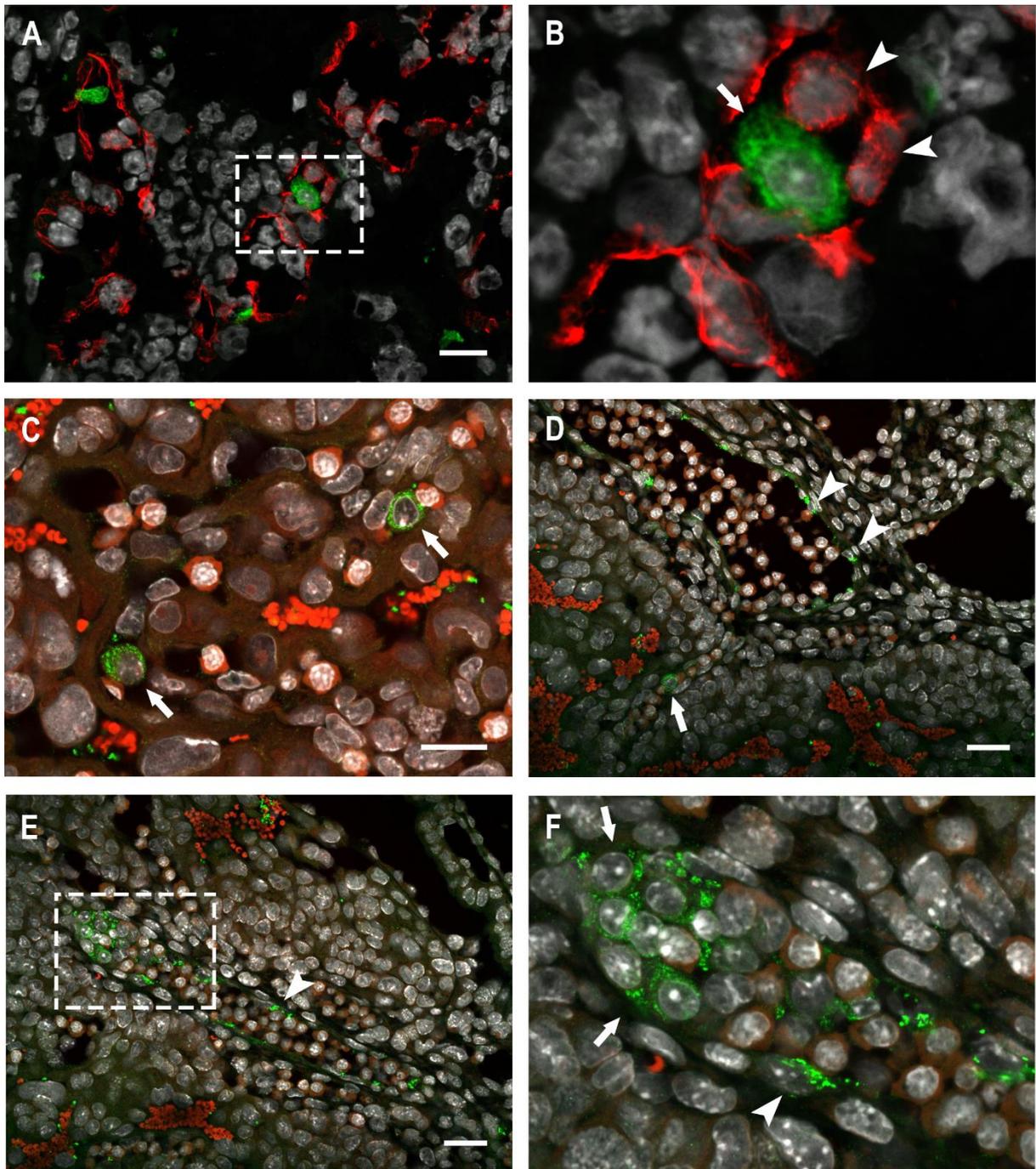


Figura 4.3.3. Fenótipo das células hematopoéticas circulantes de morfologia similar às células dos *clusters* – Marcadores de células hematopoéticas imaturas. (A) Célula hematopoética imatura no interior de um vaso fetal do labirinto identificada pela detecção fenotípica da integrina CD41. **(B)** No maior aumento da figura A é possível observar a expressão de CD41 em todo o citoplasma da célula e o nucléolo saliente que ela possui (seta). Também pode-se observar o padrão reticulado da vimentina nas células endoteliais que compõem a parede do vaso fetal e o formato arredondado, e não elíptico, de algumas destas células (cabeça de seta). **(C, D)** Expressão citoplasmática de c-Kit em células imaturas no interior de vasos fetais do labirinto (seta). Algumas células endoteliais dos vasos da placa coriônica também expressam c-Kit (cabeça de seta). **(E, F)** Algumas células endoteliais de vasos maiores da base do labirinto também expressam c-Kit (cabeça de seta). Em maior aumento é possível observar várias células hematopoéticas imaturas na extremidade deste vaso (seta).

Figs. A, B: B6, 10,5 dg; Verde: CD41 FITC, Vermelho: vimentina Alexa Fluor 546, Branco: DAPI. **Figs. C-F:** B6, 10,5 dg; Verde: c-Kit Alexa Fluor 488, Vermelho: azul de Evans, Branco: DAPI. **Figs. A-F:** Confocal LSM 710. Barra A, C= 20µm; D, E= 30 µm.

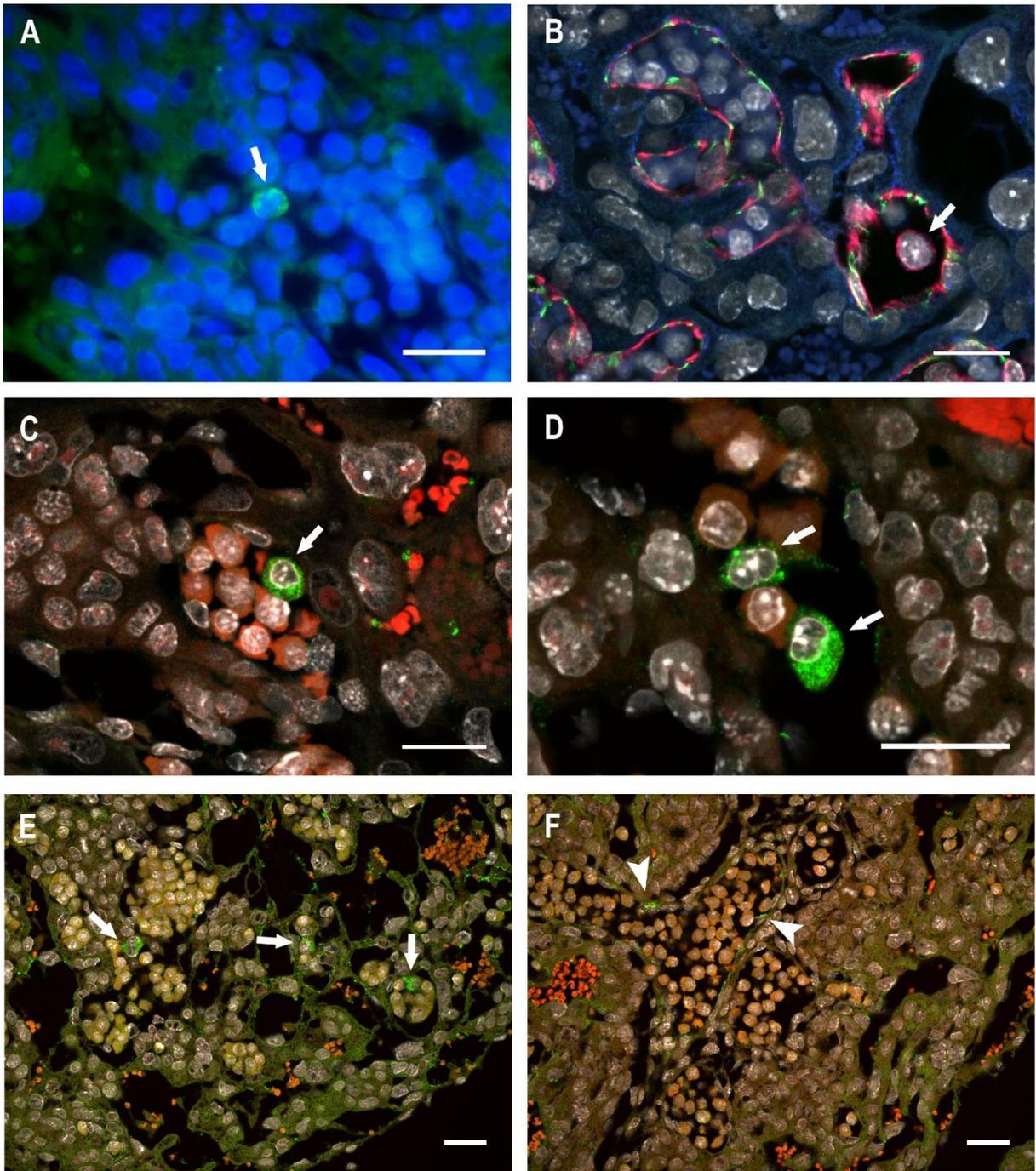


Figura 4.3.4. Fenótipo das células hematopoéticas circulantes de morfologia similar às células dos *clusters* – Marcadores de células hematopoéticas imaturas II. (A) Célula hematopoética imatura positiva para Runx1 em vaso fetal do labirinto próximo à placa coriônica (seta). **(B)** Expressão citoplasmática de vimentina em célula no interior de um vaso fetal também positivo para vimentina, e também CD31. **(C-E)** Marcação citoplasmática puntiforme do anticorpo anti-vWF em células imaturas de nucléolo saliente. **(F)** Expressão de vWF também em algumas células de vasos sanguíneos da placa coriônica.

Fig. A: B6, 10,5 dg; Verde: Runx1 Alexa Fluor 488, azul: DAPI. **Fig B:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Figs. C-D:** SW, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, Vermelho: azul de Evans, Branco: DAPI. **Figs. E-F:** B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, Vermelho: azul de Evans, Branco: DAPI. **Fig. A:** Microscópio de fluorescência Axiovert M1; **Figs. B-F:** Confocal LSM 710. Barra A-D= 20 µm; E-F= 30 µm.

4.4 Hematopoese na região de labirinto próxima à zona de junção

Outro tipo de célula hematopoética imatura foi observada nos vasos fetais do labirinto, circulando em grupos de células homogêneas (Fig. 4.4.1-A-E) ou como célula única em meio aos eritrócitos (Fig. 4.4.1-F). Estas células imaturas eram grandes, com núcleo também grande que ocupava a maior parte da célula, e exibiram cromatina frouxa e um ou dois nucléolos proeminentes (Fig. 4.4.1-A-F). Essas características morfológicas são semelhantes alguns linfócitos B ativados do organismo adulto, conhecidos como imunoblastoide. Devido a essa similaridade morfológica entre os dois tipos celulares, estas células imaturas encontradas na placenta serão chamadas de imunoblastoides.

Além de serem encontradas em grupos de células homogêneas, as células imunoblastoides foram frequentemente observadas formando *clusters* com outras células hematopoéticas imaturas heterogêneas entre si (Fig. 4.4.2). As células pareciam conectadas entre si por projeções citoplasmáticas e, às vezes, pareciam também estar aderidas ao endotélio adjacente (Fig. 4.4.2-A-E). Além das células imunoblastoides, as células dos *clusters* exibiam uma ou mais diferenças relacionadas ao tamanho, afinidade ao corante (diferentes intensidades de colorações citoplasmáticas e nucleares), e intensidade de expressão de marcadores moleculares, como o CD41 (Fig. 4.4.2-F). Algumas células apresentaram uma menor razão núcleo-citoplasma, enquanto outras possuíam núcleo bilobado ou dois núcleos (Fig. 4.4.2-C, D). Ainda, algumas células com núcleo imaturo, exibiam tamanho e coloração citoplasmática de uma célula mais madura (Fig. 4.4.2-E).

A imunofluorescência revelou um fenótipo um pouco diferente para as células imunoblastoides em relação às células descritas na seção anterior, ou entre as células imunoblastoides e as outras células dos *clusters*. As células imunoblastoides foram negativas para os anticorpos hematopoéticos c-Kit (Fig. 4.4.3-A) ou Runx1. Em contrapartida, o marcador hematopoético CD41 estava presente em uma grande população de células imunoblastoides (Fig. 4.4.3-B, C, E), embora em diferentes intensidades de expressão. Foram encontradas células negativas para vimentina (Fig. 4.4.3-D, E) e células vimentina positivas (Fig. 4.4.3-E, F). Nenhuma célula hematopoética imunoblastoide positiva para CD31 foi encontrada (Fig. 4.4.3-F). O anticorpo contra vWF marcou a maioria das células imunoblastoides ou dos clusters

(Fig. 4.4.4). Entretanto, algumas células hematopoéticas imaturas não expressaram esse marcador (Fig. 4.4.3-E, F).

Apesar de representarem uma população pequena entre as células sanguíneas fetais, as células imunoblastoides foram encontradas com maior frequência nos vasos fetais do labirinto próximos da zona de junção, principalmente quando em grupos de mais de duas células. A disposição espacial de algumas células imunoblastoides vimentina⁺ pode ser melhor visualizada na figura 4.4.5. Vasos fetais distais próximos à zona de junção contém maior quantidade de células vimentina⁺. Nesta figura, também é possível perceber que a intensidade de expressão de vimentina varia entre as células, nas quais as células próximas à zona de junção são mais intensamente positivas que as células que se afastam dessa região.

As células imunoblastoides também foram observadas projetando-se para o interior da circulação fetal, quando exibiram pedículos de adesão ou adesões mais largas junto ao endotélio adjacente (Fig. 4.4.6-A-F). Algumas células que brotavam pareciam também estar em contato com células eritroides maduras da circulação (Fig. 4.4.6-D). Algumas células que brotavam foram positivas para vimentina (Fig. 4.4.6-E, F).

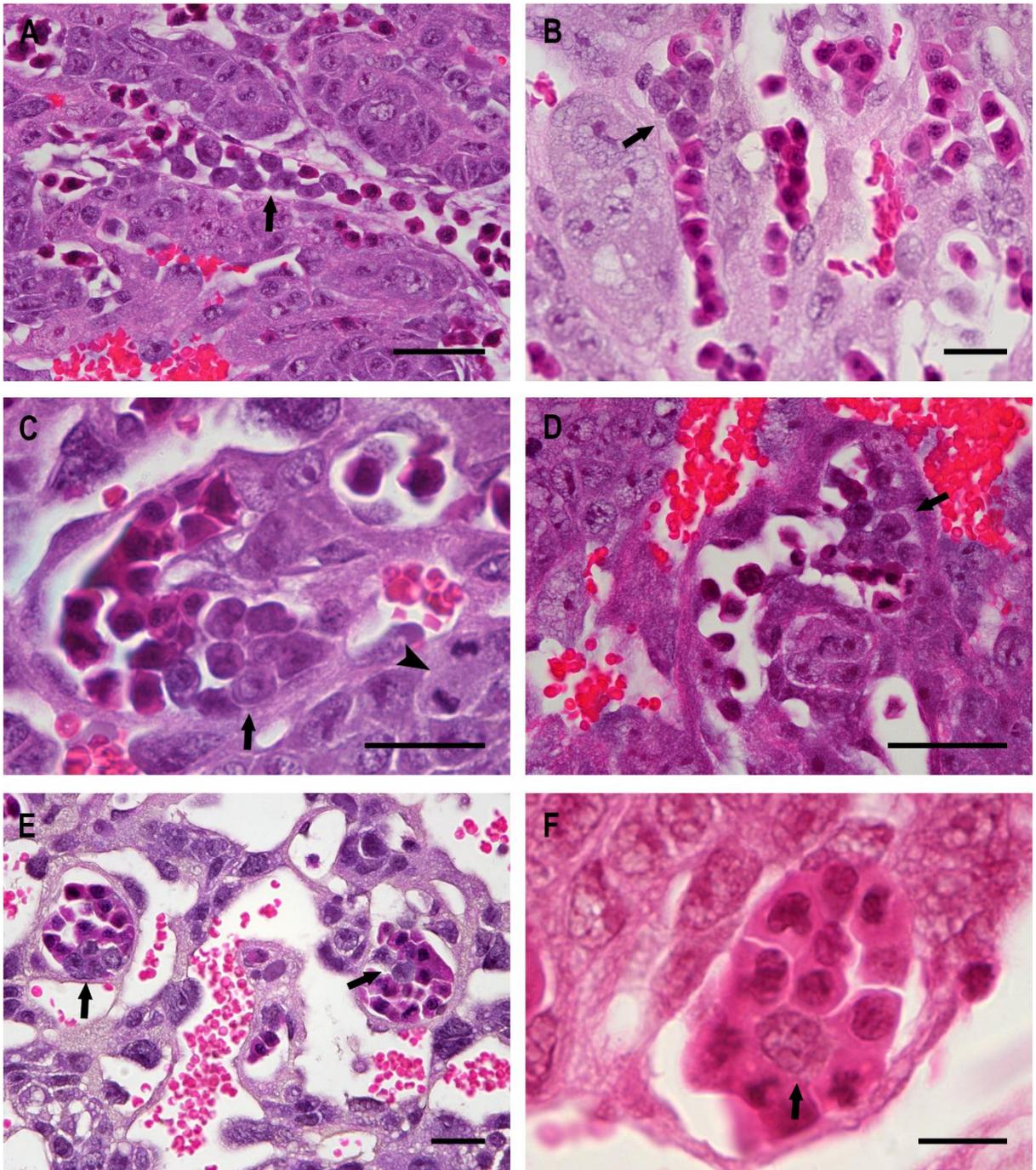


Figura 4.4.1. Células hematopóéticas imunoblastoides. (A-F) Células imunoblastoides presentes nos vasos fetais o labirinto, principalmente próximos à zona de junção. As células imunoblastoides são grandes, possuem núcleo reticulado e grande que ocupa a maior parte da célula, e ainda possui um ou dois nucléolos proeminente (seta). Célula trofoblástica realizando mitose (C: cabeça de seta).

Figs. A-D, F: SW, 10,5 dg; HE. **Figs. E:** B6, 10,5 dg, HE. Barra A-E= 20 µm; F= 10 µm.

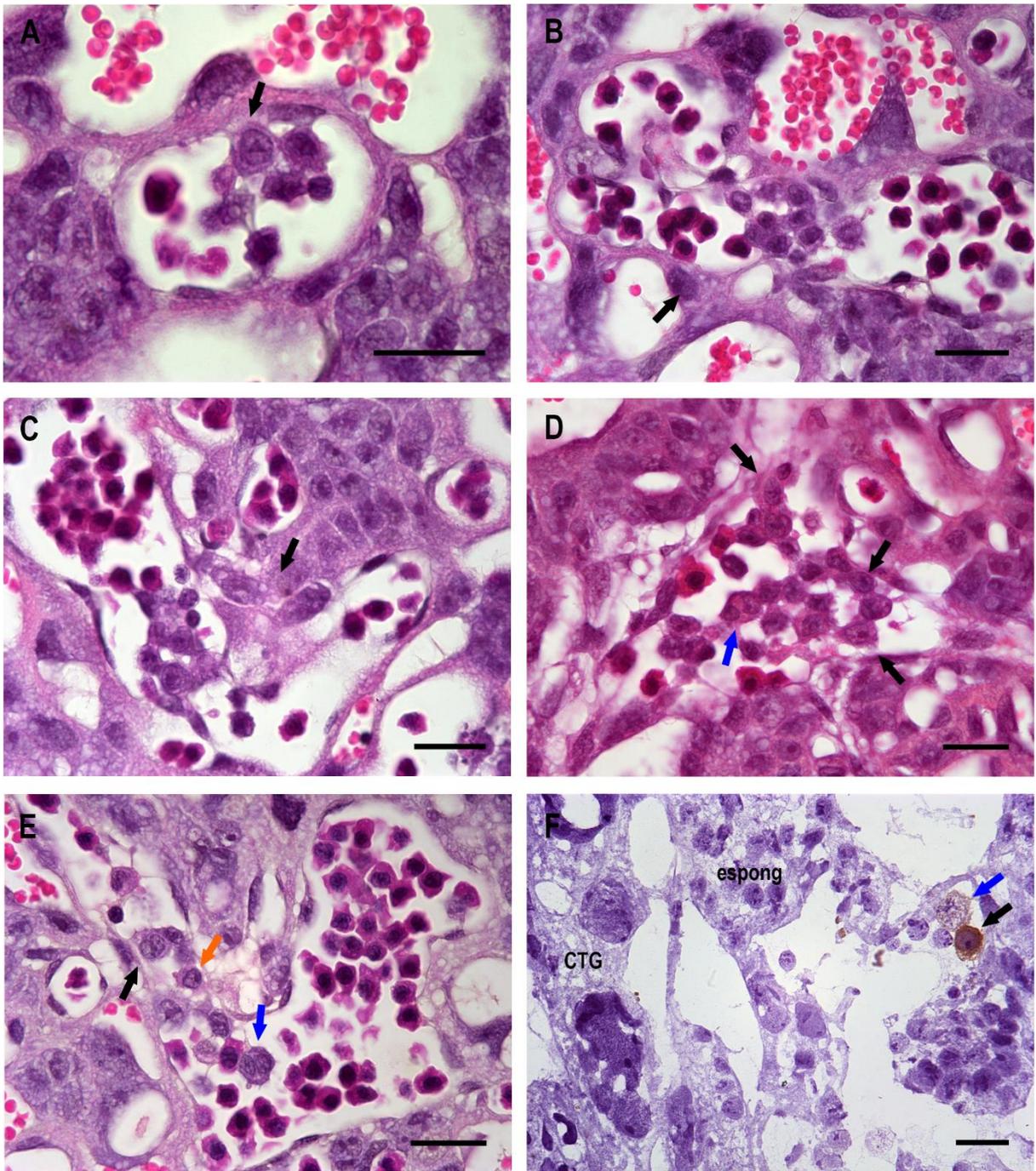


Figura 4.4.2. Heterogeneidade dos *clusters* hematopoéticos imunoblastoides. (A-C) Células imunoblastoides formando *clusters* com outras células homogêneas e células de diferentes fenótipos, nos quais as células imunoblastoides apresentavam áreas de adesões entre as células e com o vaso adjacente (seta). (D, E) O núcleo central e único das células imunoblastoides se contrastava com algumas células com núcleo bilobado reticulado e, às vezes, com nucléolo visível (seta azul). Algumas células com núcleo imaturo, exibiam tamanho e coloração citoplasmática de uma célula mais madura (seta laranja). (F) Duas células imunoblastoides adjacentes exibem diferenças na quantidade de integrina CD41 no citoplasma, com uma delas sendo fortemente positiva ao anticorpo anti-CD41 (seta preta) e a outra com expressão mais sutil (seta azul).

Figs. A-E: B6, 10,5 dg, HE; **F:** B6, 10,5 dg, CD41 e hematoxilina. Barra= 20 µm.

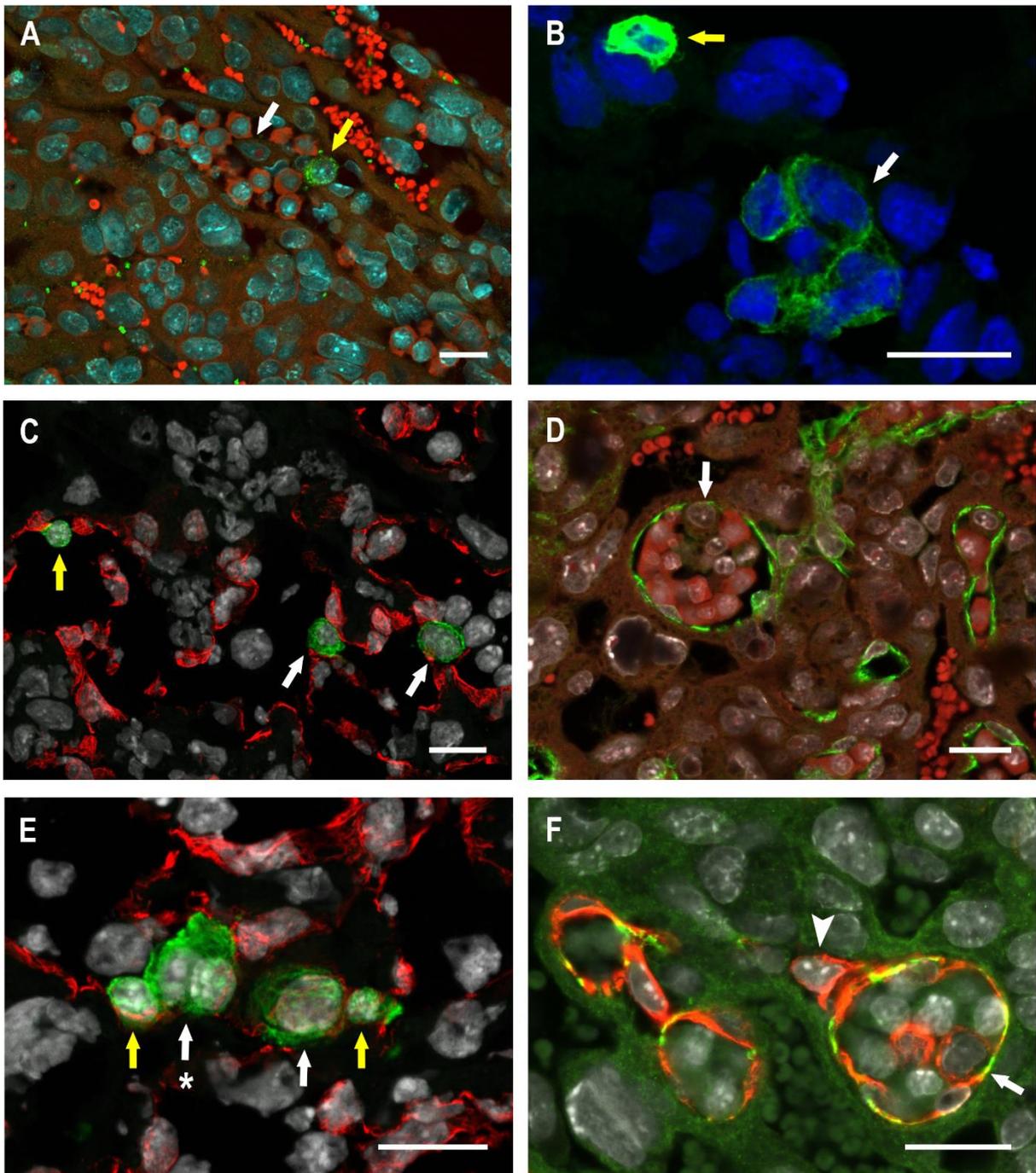


Figura 4.4.3. Fenótipo das células hematopoéticas imunoblastoides e clusters. (A) Duas células imaturas na circulação fetal do labirinto, a menor delas $c\text{-Kit}^+$ (seta amarela) e a outra, maior e imunoblastoide, é $c\text{-kit}^-$ (seta branca). (B, C) Células imunoblastoides CD41^+ (seta branca), às vezes de forma menos intensa do que células menores próximas (B: seta amarela), ou na mesma intensidade (C: seta amarela). (D) Clusters heterogêneos cuja célula imunoblastoide próxima ao endotélio é vimentina $^-$ (seta). (E) Cluster de células heterogêneas, no qual células imunoblastoides (seta branca) e células menores (seta amarela) são CD41^+ e vimentina $^+$. Duas células imunoblastoides, a da direita contém CD41 e filamentos de vimentina e a da esquerda apenas CD41 (*). (F) Células imunoblastoides vimentina $^+$ aparentemente aderidas ao vaso (seta). Apenas células endoteliais são CD31^+ . Células globosas vimentina $^+$ na parede de alguns vasos (cabeça de seta).

Fig. A: B6, 10,5 dg; Verde: $c\text{-Kit}$ Alexa Fluor 488, Vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Fig. B:** B6, 10,5 dg; Verde: CD41 FITC, azul: DAPI. **Figs. C, E:** B6, 10,5 dg; Verde: CD41 FITC, vermelho: vimentina Alexa Fluor 546, Branco: DAPI. **Fig. D:** B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 635, branco: DAPI. **Fig. F:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, Vermelho: vimentina Alexa Fluor 546, Branco: DAPI. **Fig. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 20 μm .

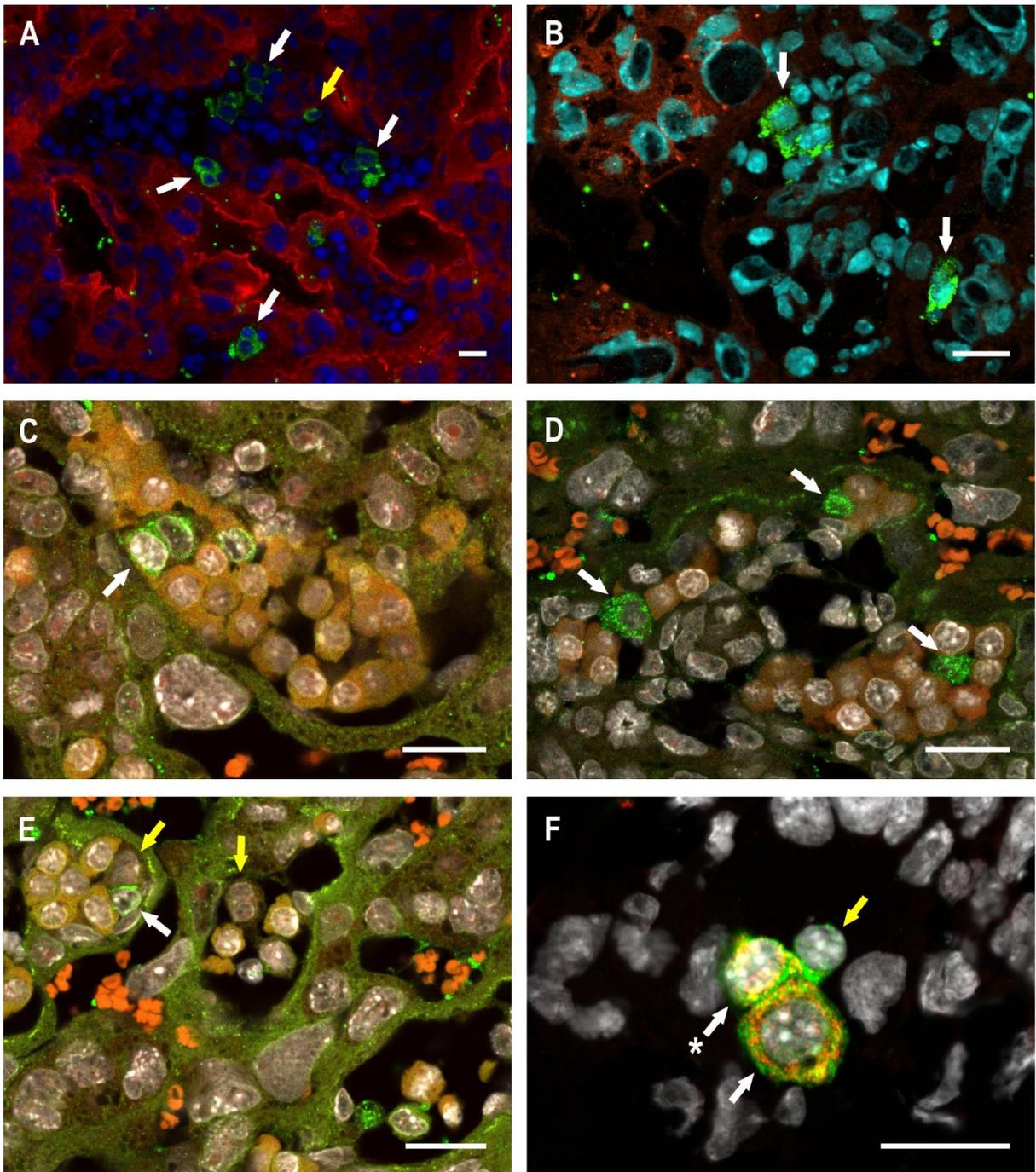


Figura 4.4.4. Expressão de vWF nas células imunoblastoides e clusters. (A, D) Clusters (seta branca) ou células isoladas (seta amarela) imaturas presentes principalmente próximos da zona de junção expressam fenotipicamente vWF. (E) Alguns clusters de células imaturas imunoblastoides formados com células positivas (seta branca) e negativas (seta amarela) para vWF. (F) Cluster composto por células de diferentes tamanhos e organização nuclear aparentemente aderidas entre si, no qual as células maiores e imunoblastoides expressam CD41 e vWF (seta branca) e a célula menor (seta amarela) apenas CD41. É possível observar heterogeneidade entre células imunoblastoides, com uma delas exibindo maior intensidade de CD41 em relação à vWF (*) e a outra com quantidades aparentemente semelhantes das duas proteínas.

Fig. A: B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: Troma Alexa Fluor 594, azul: DAPI. **Fig. B:** B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Figs. C, E:** B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. D:** SW, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. F:** B6, 10,5 dg; Verde: CD41 FITC, vermelho: vWF Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. A:** Microscópio de fluorescência Axiovert M1. **Fig. B-F:** Confocal LSM 710. Barra= 20 µm.

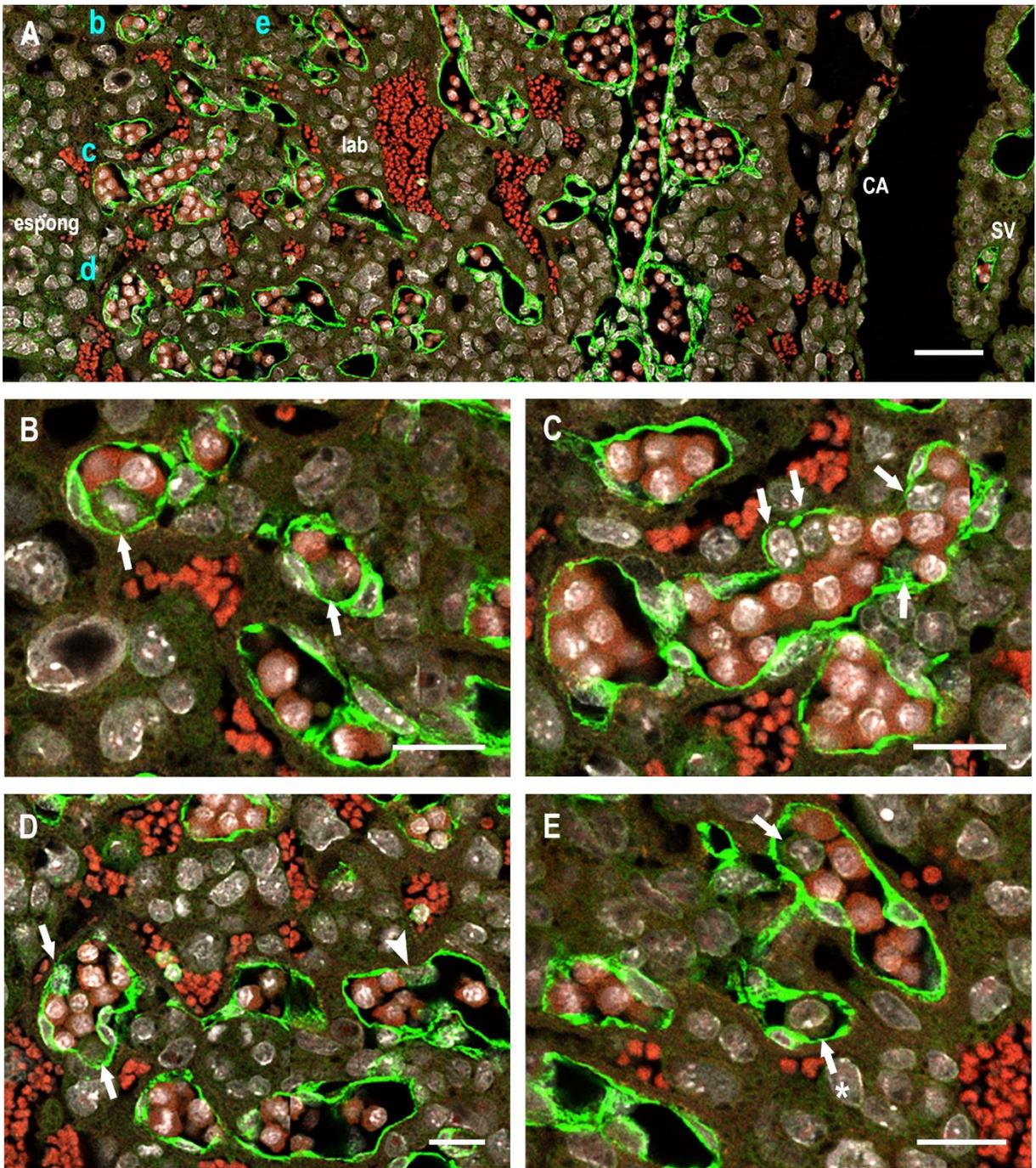


Figura 4.4.5. Distribuição espacial de células imaturas no labirinto que expressam vimentina. (A) Distribuição de células imaturas no labirinto (lab) que expressam fenotipicamente vimentina da placenta de camundongos. (B-E) Vasos fetais distais e mais próximos ao espongiotrofoblasto (espong) contém grande número de células imaturas vimentina positivas com intensidades de expressão variáveis. Algumas células imunoblastoides com quantidade de vimentina quase imperceptível (E: *). Devido à morfologia e intensidade de expressão de vimentina, algumas células positivas na parede do vaso deixavam dúvidas se eram células endotélias ou hematopoéticas (D: cabeça de seta). CA: membrana corioalantoica; SV: saco vitelínico.

Fig. A-E: B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 635, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra A= 50 µm; B-E= 20 µm.

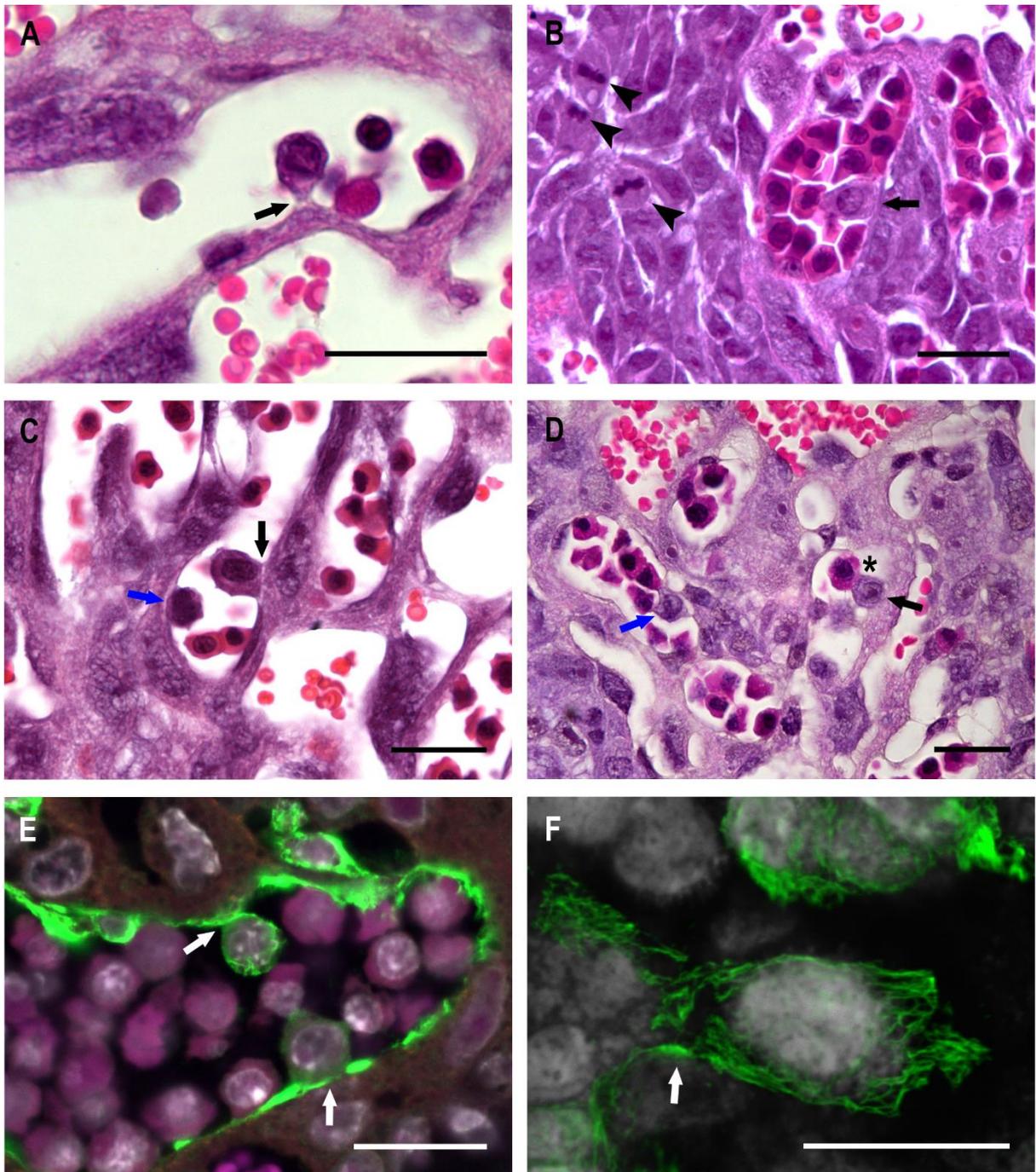


Figura 4.4.6. Brotamento intraluminal de células hematopoéticas imunoblastoides. (A, C) Projeção de células imunoblastoides para o interior dos vasos sanguíneos fetais, cujas células exibiram pedículos (A: seta) ou adesões mais largas (B, C: seta preta) ao endotélio adjacente. Células imaturas que não estavam brotando estão presentes na imagem próximas ao endotélio (C: seta azul). (D) Algumas células imunoblastoides brotavam de um vaso sem organização endotelial visível aonde exibiram adesões largas aos trofoblasto adjacente (seta preta). Elas também estavam aderidas a eritrócitos nucleados da circulação fetal por adesões largas (*) ou prolongamentos citoplasmáticos mais finos (seta azul). (E, F) Algumas células que brotavam para o lúmen de vasos fetais expressavam vimentina no citoplasma em intensidades variáveis.

Figs. A, D: B6, 10,5 dg; HE. **Fig. B:** SW, 10,5 dg; HE. **Fig. C:** SW, 11,5 dg; HE. **Fig. E:** B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. E:** B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 594, roxo: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. F:** B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, branco: DAPI. **Figs. E, F:** Confocal LSM 710. Barra= 20 μm.

4.5 Células hematopoéticas imaturas presentes na placenta aos 9,5 e 12,5 dg

Raras células hematopoéticas foram identificadas na placenta em idades gestacionais diferentes de 10,5 e 11,5 dg. Aos 9,5 dg, células vWF positivas foram ocasionalmente encontradas na região de labirinto (Fig. 4.5.1-A, B, C). Estas células eram pequenas e heterogêneas entre si, visto que uma ou outra apresentou núcleo bilobado ou dois núcleos (Fig. 4.5.1-B). Às vezes, as células vWF positivas foram observadas no interior do vaso sanguíneo em formação (Fig. 4.5.1-C). Nenhuma célula endotelial da placenta foi positiva para vWF. Células que expressaram vimentina também foram encontradas na placenta aos 9,5 dg. Porém, nessa idade, a expressão de vimentina foi fraca e as células positivas apresentaram um fenótipo nuclear-citoplasmático mais diferenciado e não típico de célula hematopoética imatura (Fig. 4.5.1-D). *Clusters* de células pequenas, homogêneas e positivas para vimentina foram localizados nessa idade em vasos fetais da placa coriônica (Fig. 4.5.1-E, F). O núcleo dessas células era diferente das células hematopoéticas imaturas encontradas aos 10,5 ou 11,5 dg e eram bastante similares às células do mesênquima corioalantoico adjacente (Fig. 4.5.1-F).

Aos 12,5 dg, foram observadas raras células circulantes vWF positivas de fenótipo imaturo (Fig. 4.5.2-A) ou exibindo núcleo bilobado ou dois núcleos (Fig. 4.5.2-B). Em contrapartida, mais células endoteliais dos vasos fetais da placa coriônica foram positivas para vWF (Fig. 4.5.2-C, D).

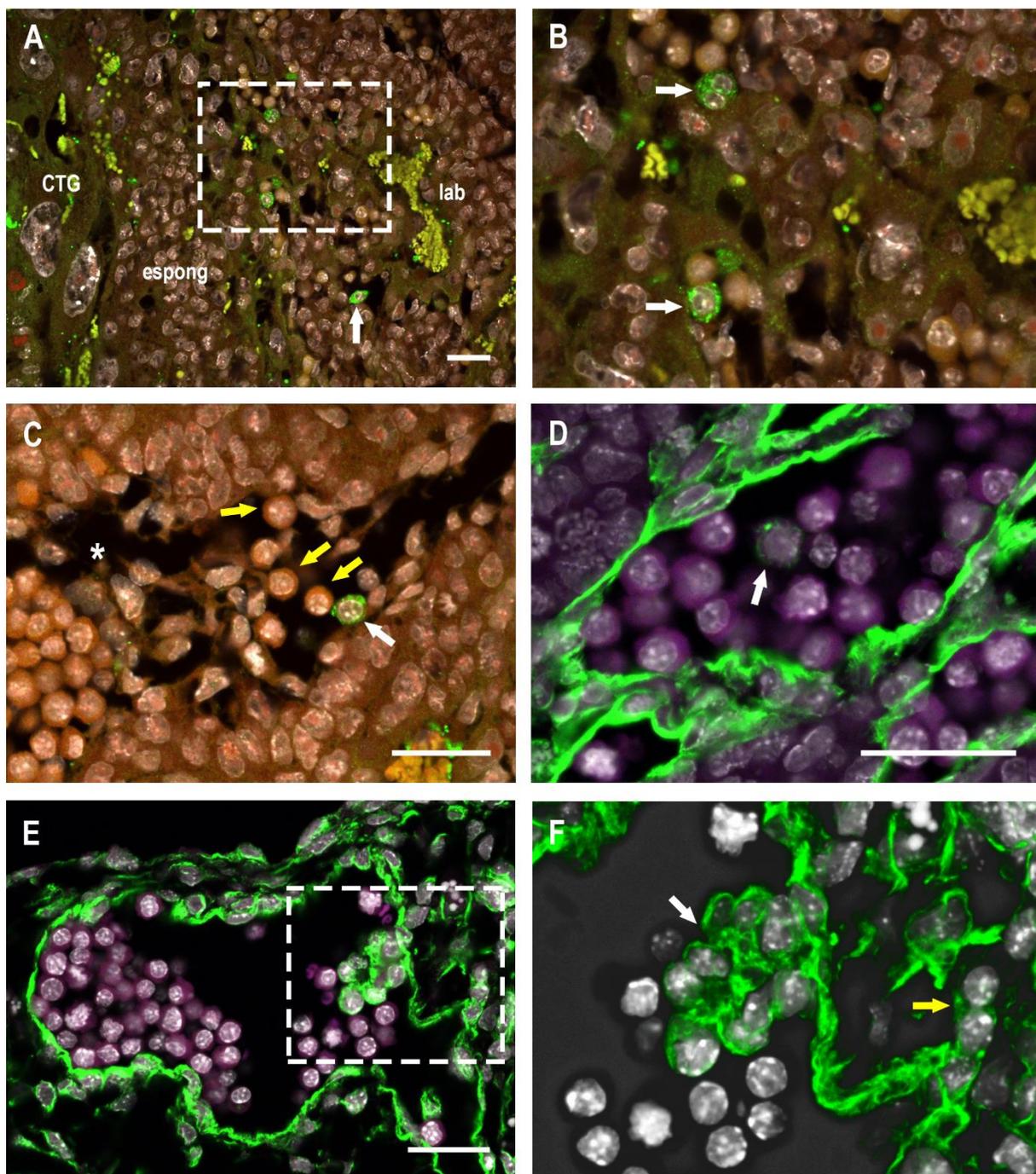


Figura 4.5.1. Células hematopoéticas imaturas aos 9.5 dg. (A) Expressão de vWF em células imaturas do labirinto da placenta com 9,5 dg (seta). (B) No maior aumento é possível observar que as células vWF positivas são morfologicamente diferentes quanto ao arranjo nuclear (setas). (C) Morfogênese do labirinto com a organização de vasos sanguíneos oriundos da alantoide (*). Presença de eritroblastos nucleados (seta amarela) e células imaturas vWF positivas (seta azul) no interior do vaso recém-formado. (D) Alguns eritroblastos expressavam fracamente vimentina no seu citoplasma (seta). (E, F) Aglomerados de células vimentina positivas nos vasos da placa coriônica. O fenótipo destas células (seta branca) era similar às células do mesênquima corioalantoico adjacentes (seta amarela). F: Projeção ortogonal em z de planos tomográficos sucessivos.

Figs. A-C: SW, 9,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. D-F:** SW, 9,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, branco: DAPI. **Figs. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 μm.

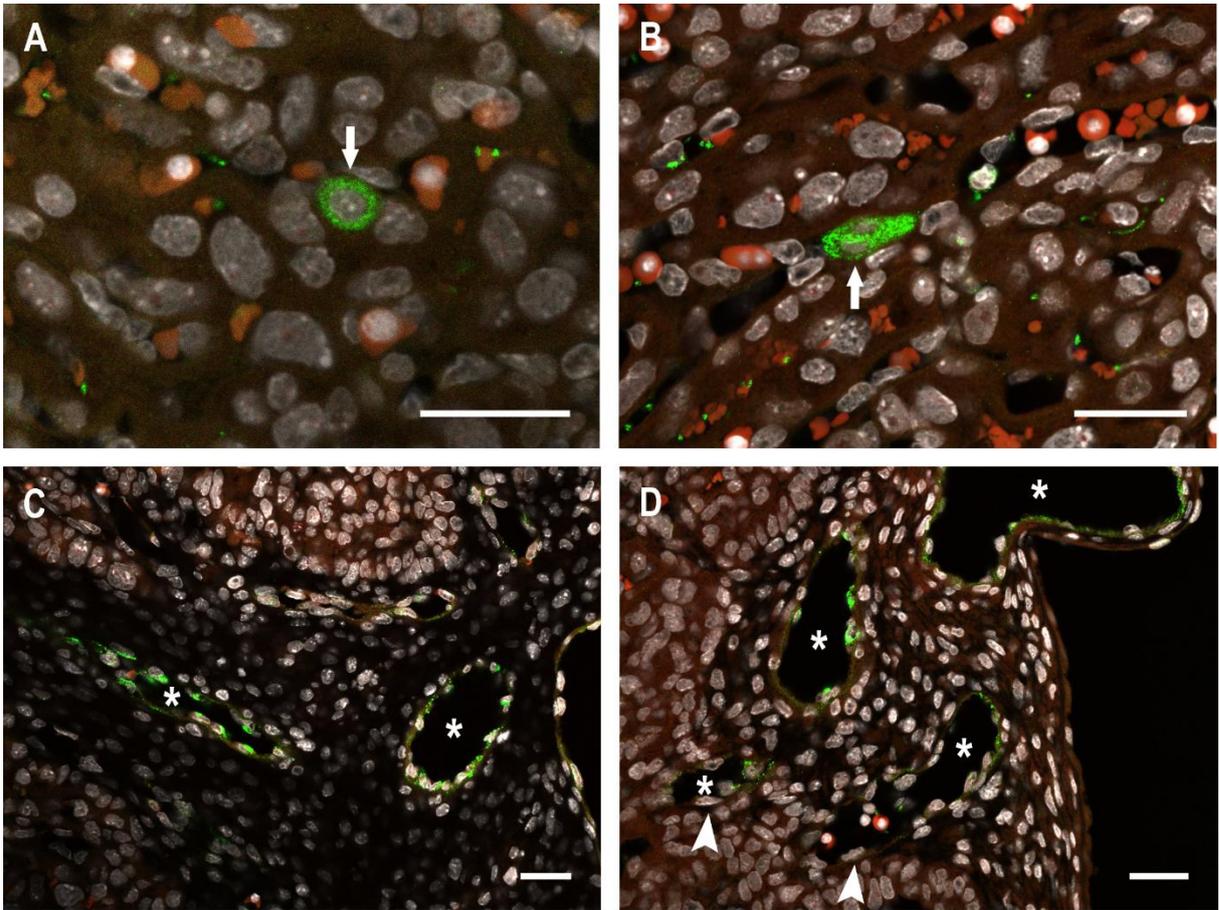


Figura 4.5.2. Expressão de vWF nas células hematopoéticas imaturas aos 12.5 dg. (A, B) Presença de células imaturas vWF positivas na circulação fetal do labirinto aos 12,5 dg (seta). **(C, D).** Os vasos sanguíneos da placa coriônica (*) são formados por células endoteliais que expressam vWF, com exceção de algumas células negativas para esse fator (D: cabeça de seta).

Figs. A-D: SW, 12,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

4.6 Eritropoese na região de labirinto próxima à zona de junção

Foram observados focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção de placentas com 10,5 e 11,5 dg. Estes focos consistiram em aglomerados de células imunoblastoides aparentemente unidos entre si e a outras células da linhagem eritroide em diferentes estágios de diferenciação (Fig. 4.6.1). Alguns focos eritropoéticos pareciam estar aderidos ao endotélio adjacente (Fig. 4.6.1-A, B, C). Outros focos não pareciam estar completamente envolvidos por uma estrutura vascular, nos quais o endotélio descontínuo dava lugar a uma massa intrincada de células hematopoéticas e células trofoblásticas (Fig. 4.6.1-D, E, F).

Também foram encontrados focos eritropoéticos formados por células em organização menos compacta. Algumas ainda mantinham certa adesão entre si, sugerindo que estavam previamente organizadas em *clusters* maciços, e que as células começaram a ser liberadas na circulação sanguínea (Fig. 4.6.2-A-D). Foi observado endotélio descontínuo também ao redor destes focos eritropoéticos (Fig. 4.6.2-A). Às vezes, células semelhantes às imunoblastoides foram observadas em posição de célula endotelial do vaso que envolvia o foco eritropoético (Fig. 4.6.2-B-D). Foi possível observar células já comprometidas com a linhagem eritroide, identificadas pela coloração citoplasmática por Giemsa de Lennert e HE, exibindo o mesmo padrão nuclear das células imunoblastoides: núcleo grande com cromatina frouxa e nucléolos salientes (Fig. 4.6.2-B). Os eritrócitos já diferenciados dos focos eritropoéticos também possuíam um fenótipo nuclear mais imaturo, eram mais globosos e com superfície mais regular, e vários apresentavam morfologia sugestiva de processo mitótico (Fig. 4.6.2-E, F). Outros eritrócitos encontrados em vasos próximos à zona de junção mas sem estar organizados em focos, apresentavam fenótipo similar, além de terem sido observadas várias figuras mitóticas.

A imunomarcção com o anticorpo anti-CD31 evidenciou o endotélio descontínuo ao redor dos focos eritropoéticos (Fig. 4.6.3-A, B). A lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) se ligou de forma heterogênea nas células endoteliais dos vasos fetais do labirinto, revelando a heterogeneidade endotelial destes vasos. (Fig. 4.6.3-C). O anticorpo contra caderina foi positivo na periferia das células trofoblásticas da região do labirinto. A maioria dos eritrócitos apresentou positividade membranar e citoplasmática a esse anticorpo, contrastando com raros eritrócitos circulantes negativos para a marcação (Fig. 4.6.3-D). Algumas células trofoblásticas gigantes da

camada parietal (Fig. 4.6.3-E) e algumas células da decídua apresentaram positividade citoplasmática para hepcidina-25 (Fig. 4.6.3-F). A eritropoetina foi negativa no labirinto, mas estava presente em algumas células do espongiotrofoblasto (Fig. 4.6.4-A, B), no citoplasma da maioria das células uNK (Fig. 4.6.4-C, D) e em algumas CTG (Fig. 4.6.4-E).

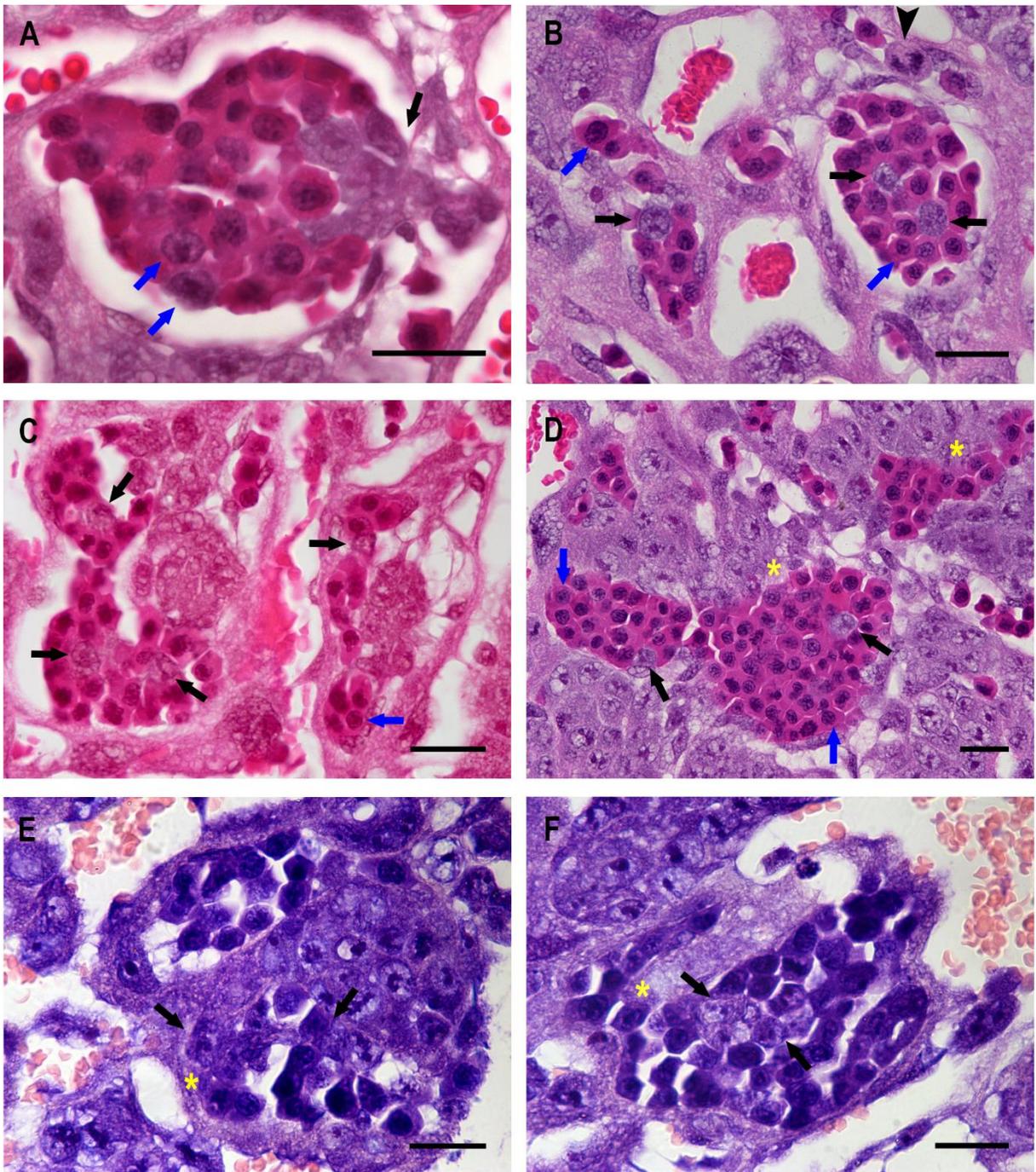


Figura 4.6.1. Focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção - I. (A, F) Focos eritropoéticos compostos por células imunoblastoides (seta preta) aderidas entre si e a outras células da linhagem eritroide em diferentes estágios de diferenciação. As células eritroides destes arranjos são grandes e possuem núcleo grande central e reticulado, muitas vezes com dois nucléolos salientes (seta azul). Focos eritropoéticos aderidos ao endotélio adjacente pelas células imunoblastoides (A). Outros focos não possuem organização vascular evidente, muitas vezes sem endotélio aparente ao redor (D, E, F: * amarelo).

Fig. A: SW, 11,5 dg; HE. **Figs. B-D:** SW, 10,5 dg; HE. **Figs. E-F:** SW, 10,5 dg; Giemsa de Lennert. Barra= 20 µm.

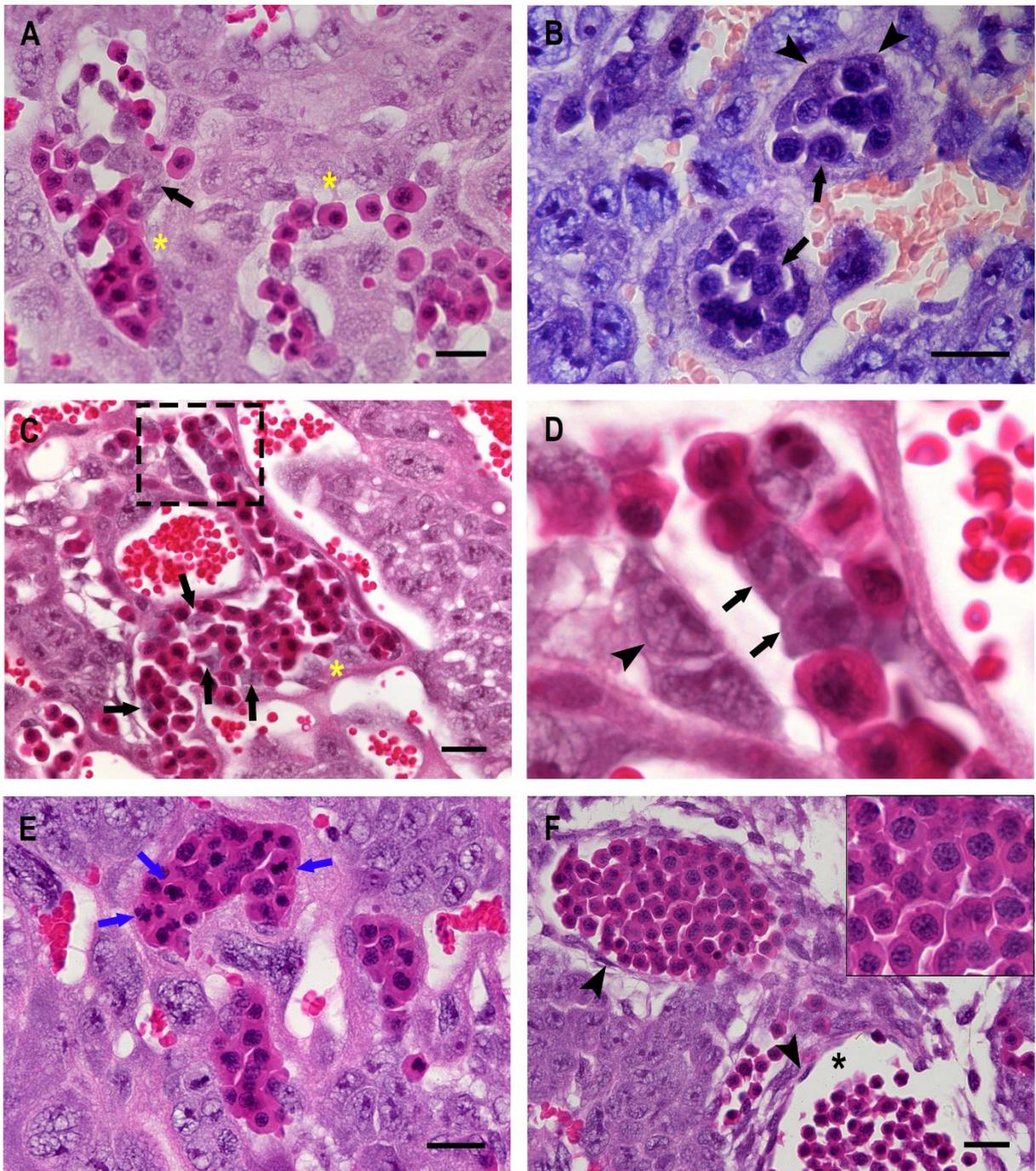


Figura 4.6.2. Focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção - II. (A, D) Focos eritropoéticos compostos por células imunoblastoides (seta preta) aderidas entre si e a outras células da linhagem eritroide em diferentes estágios de diferenciação. É possível observar endotélio descontínuo ao redor de alguns focos eritropoéticos (*). Células semelhantes às imunoblastoides em posição de célula endotelial (B-D: cabeça de seta). (E) Várias figuras mitóticas nos eritrócitos em vasos congestionados de células (seta). (F) Vasos fetais envolvidos por endotélio típico (cabeça de seta) contendo dois tipos de eritrócitos morfologicamente diferentes no seu interior. Um deles consiste em células grandes, com núcleo grande central e reticulado, muitas vezes com dois nucléolos salientes (*inset*). No outro vaso, os eritrócitos são menores, possuem superfície irregular e núcleo basofílico (*).

Fig. A: SW, 11,5 dg; HE. **Fig. B:** SW, 10,5 dg; Giemsa de Lennert. **Figs. C-F:** SW, 10,5 dg; HE. Barra= 20 µm.

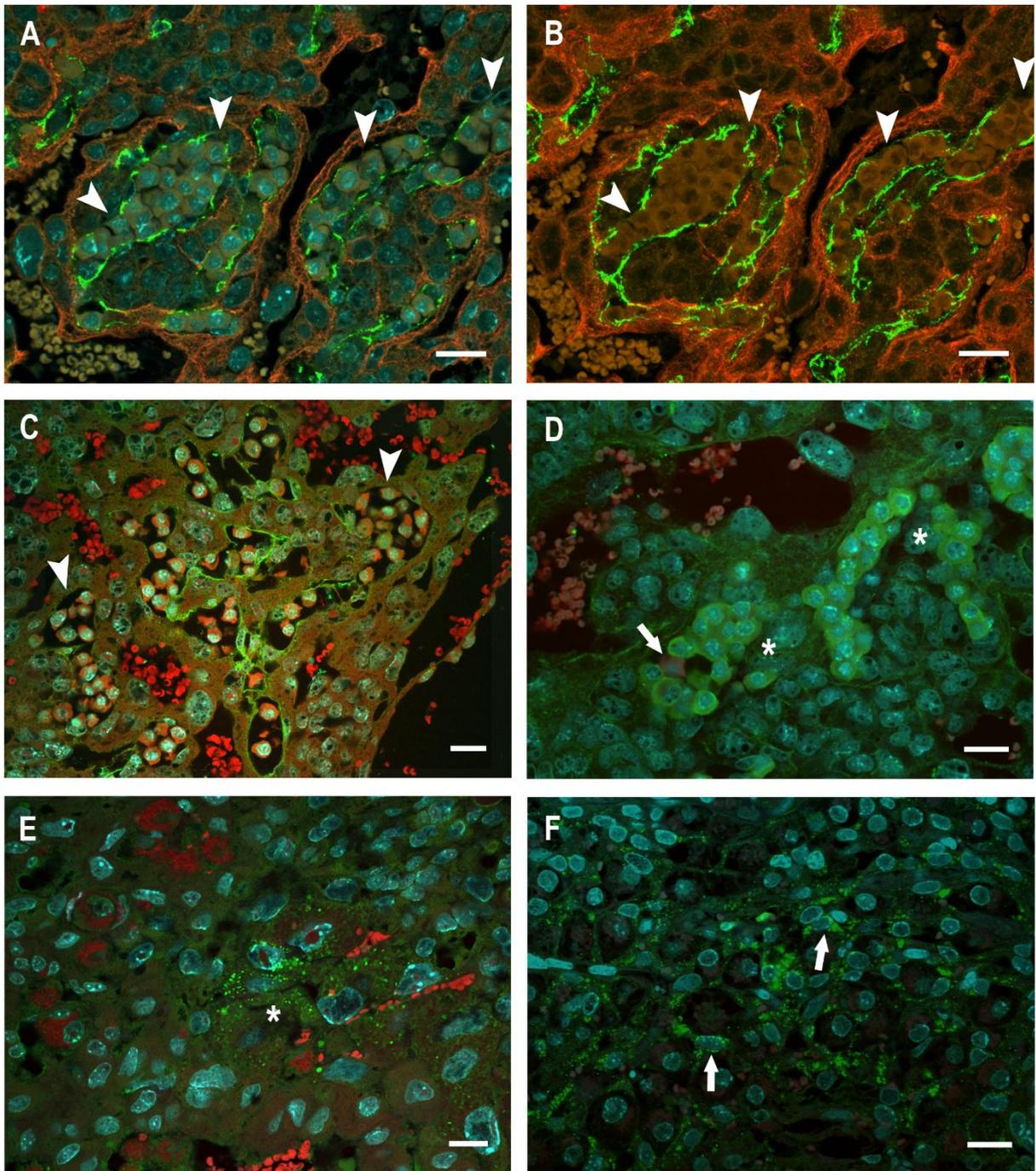


Figura 4.6.3. Imunofluorescência para caracterização da eritropoese. (A, B) O endotélio descontínuo de alguns vasos fetais próximos da zona de junção é evidenciado após imunofluorescência para detecção de CD31 nas células endoteliais. A ausência de endotélio que expresse CD31 (cabeça de seta) pode ser observada em apenas um plano focal (A) e depois da projeção ortogonal de cortes tomográficos (B). (C) A lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) marcou algumas células endoteliais dos vasos fetais, enquanto algumas células não foram marcadas por essa lectina. (D) Presença de caderina na periferia das células trofoblásticas do labirinto, bem como nos eritrócitos da circulação fetal, os quais possuem uma marcação difusa. Alguns eritrócitos não expressam caderina (seta). (E, F) Presença de hepcidina-25 em grânulos de algumas CTG (*) e em algumas células da decidua (seta).

Figs. A, B: B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Troma, ciano: DAPI. **Fig. C:** SW, 10,5 dg; Verde: PNA FITC, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Fig. D:** SW, 11,5 dg; Verde: Caderina, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Figs. E, F:** B6, 10,5 dg; Verde: Hepcidina-25 Alexa Fluor 488, vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Figs. A, B, E, F:** Confocal LSM 710; **Figs. C-D:** Confocal 510 META. Barra= 20 µm.

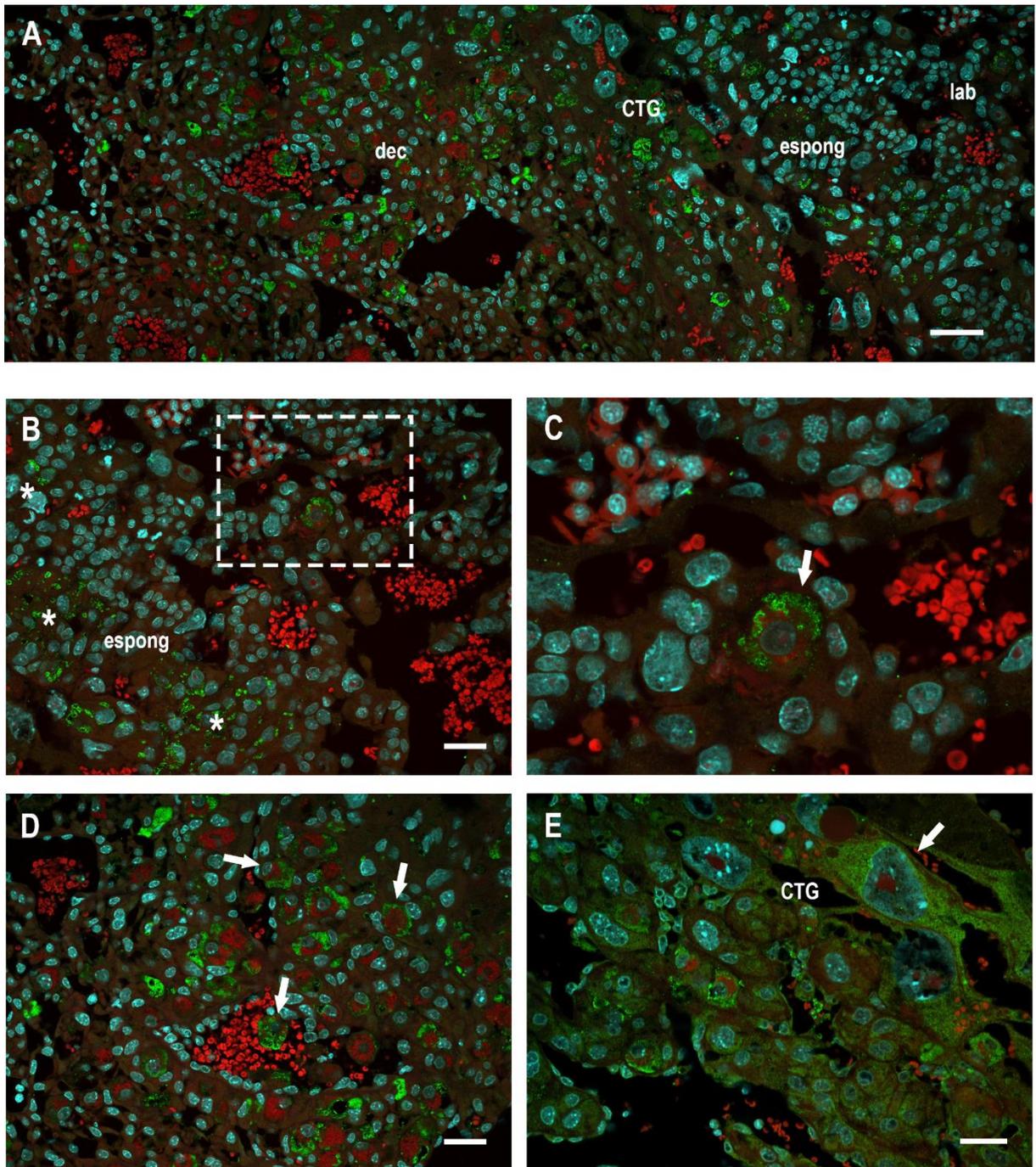


Figura 4.6.4. Detecção de eritropoietina na placenta de camundongos. (A) Imagem panorâmica da distribuição de eritropoietina (EPO) na placenta de camundongos. (B-E) A EPO estava presente em várias células espongiotrofoblásticas (B: *), no citoplasma de algumas células NK uterinas (C, D: setas) e em algumas células trofoblásticas gigantes (E: seta).

Figs. A-E: SW, 10,5 dg; Verde: EPO Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Figs. A-D:** Confocal LSM 710; **Fig. E:** Confocal 510 META. Barra A= 50 µm; B-E= 30 µm.

4.7 Caracterização da eritropoese placentária após a administração de eritropoetina exógena

Quatro fêmeas que receberam rhEPO foram analisadas, duas com 10,5 dg e duas com 11,5 dg. Elas tiveram a maioria dos sítios implantacionais viáveis, e que não apresentaram diferenças visíveis na análise macroscópica em relação a animais SW que não receberam rhEPO. Alguns sítios implantacionais com 10,5 dg apresentaram um aumento no número de células grandes com citoplasma eosinofílico e núcleo basofílico, que apresentavam formatos variáveis. Uma camada visível destas células foi observada entre a decídua e a camada de CTG, com algumas células também presentes próximas à porção distal do labirinto (Fig. 4.7.1-A, B). A região de labirinto de algumas placentas não apresentou arranjos eritropoéticos (Fig. 4.7.1-C). Na região de labirinto de outros sítios implantacionais, algumas placentas continham vasos fetais estreitos próximos à zona de junção, os quais continham eritrócitos globosos e grandes. Focos eritropoéticos foram observados nessas placentas próximos à zona de junção (Fig. 4.7.2). Semelhante aos focos observados em camundongos sem injeção de rhEPO, eles eram formados por aglomerados de eritrócitos globosos e de arranjo nuclear imaturo distintos, e possivelmente aderidos a células imunoblastoides (Fig. 4.7.2-A-E). Muitas vezes, a ausência de endotélio visível ao redor dos focos evidenciava uma massa de células hematopoéticas que se misturavam, e às vezes se confundiam, com as células trofoblásticas adjacentes (Fig. 4.7.2-A-D, F).

Os sítios implantacionais com 10,5 dg que receberam rhEPO foram submetidos à imunofluorescência. Células do espongiotrofoblasto, células uNK e algumas células gigantes expressaram eritropoetina (Fig. 4.7.3-A, B, C). As células gigantes que continham EPO no citoplasma possuíam formato semelhante às células eosinofílicas que estavam em maior número na coloração de HE (Fig. 4.7.3-C). O anticorpo anti-VEGF marcou quase todas as células do labirinto, mas principalmente nas CTH e ao redor dos vasos fetais do labirinto (Fig. 4.7.3-D). A vimentina foi positiva em alguns vasos da decídua e para o endotélio fetal da região de labirinto (Fig. 4.7.4-A, B). Além disso, algumas células hematopoéticas no interior dos vasos fetais expressaram esse marcador (Fig. 4.7.4-B). A molécula CD31 estava presente em vasos da decídua, bem como algumas células do espongiotrofoblasto (Fig. 4.7.4-C). Células endoteliais fetais do labirinto e algumas células no interior dos vasos também foram positivas para o anticorpo anti-CD31 (Fig. 4.7.4-D).

A análise microscópica dos sítios implantacionais com 11,5 dg não revelou arranjos eritropoéticos (Fig. 4.7.5-A-C). A organização das camadas da placenta foi bastante similar à placenta de camundongos da mesma idade que não receberam rhEPO (Fig. 4.1.4-A-E).

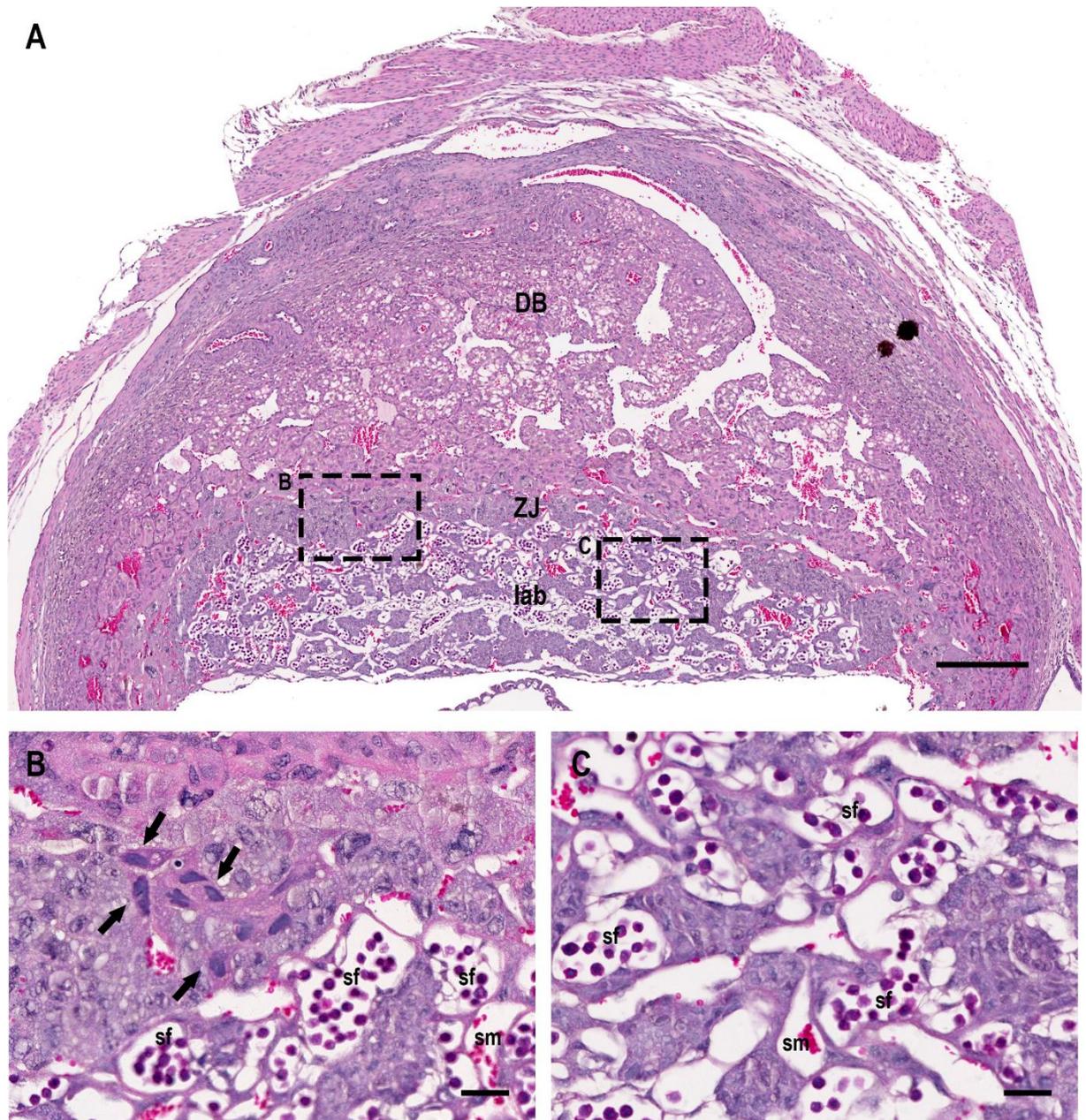


Figura 4.7.1. Placenta de camundongos aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos aos 10,5 dg após a mãe receber injeção subcutânea de rhEPO no dia anterior. (B) Células grandes com citoplasma eosinofílico e núcleo basofílico próximas à porção distal do labirinto (setas). (C) Labirinto da placenta com vasos contendo sangue fetal (sf) e espaços de sangue materno (sm).

Figs. A-C: SW, 10,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 300µm; B, C= 30 µm.

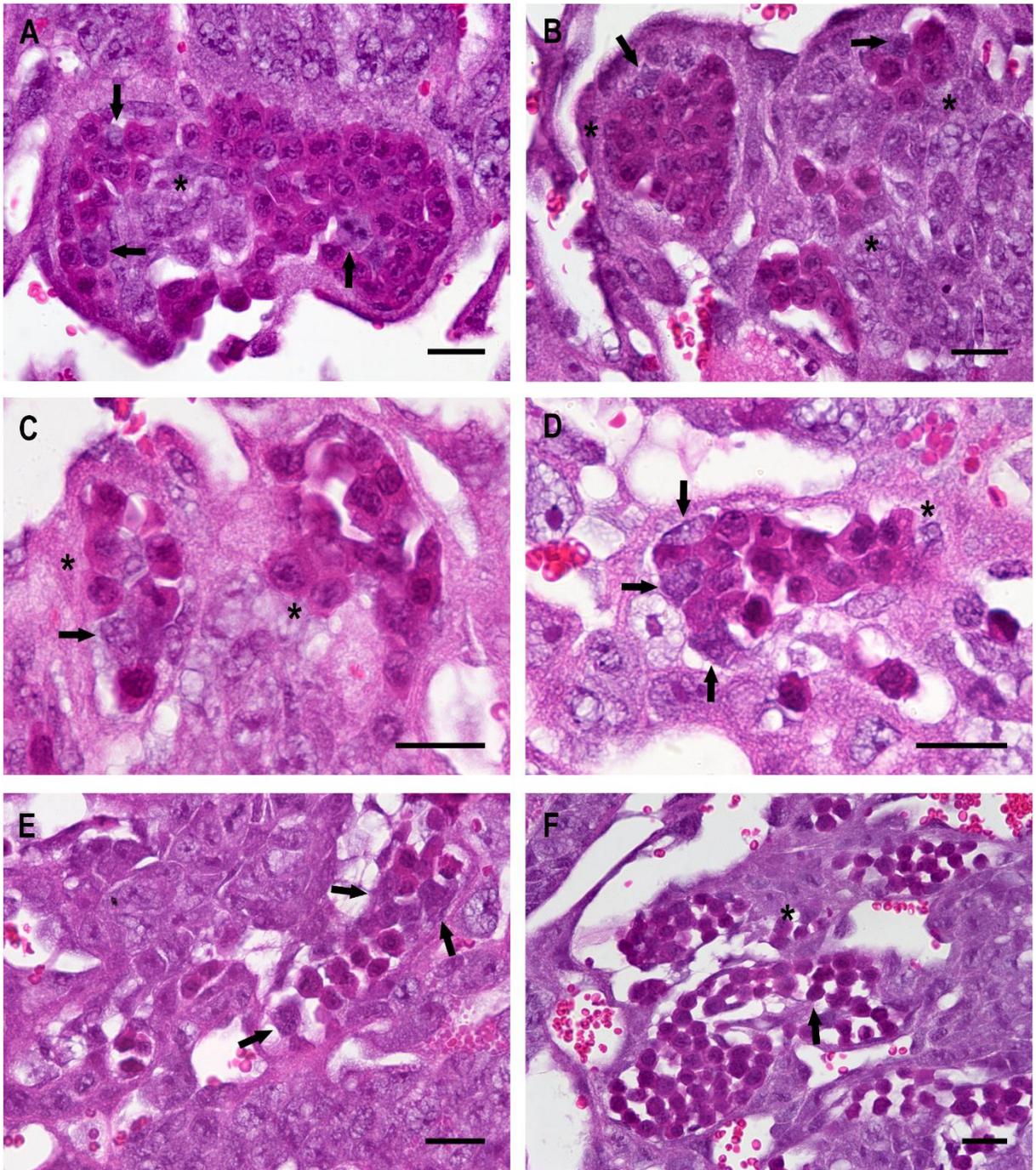


Figura 4.7.2. Focos eritropoéticos da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg. (A-F) Focos eritropoéticos na região de labirinto próximos à zona de junção compostos por células imunoblastoides (setas) aderidas a eritrócitos grandes, globosos e com núcleo reticulado. O endotélio aparentemente descontínuo ao redor de alguns focos eritropoéticos (*), algumas vezes levando a uma configuração morfológica de um maciço de células eritroides e trofoblasto adjacente (A, B). Eritrócitos grandes e com núcleo reticulado em agregados menos compactos (F).

Figs. A-C: SW, 10,5 dg; HE. Barra= 20 µm.

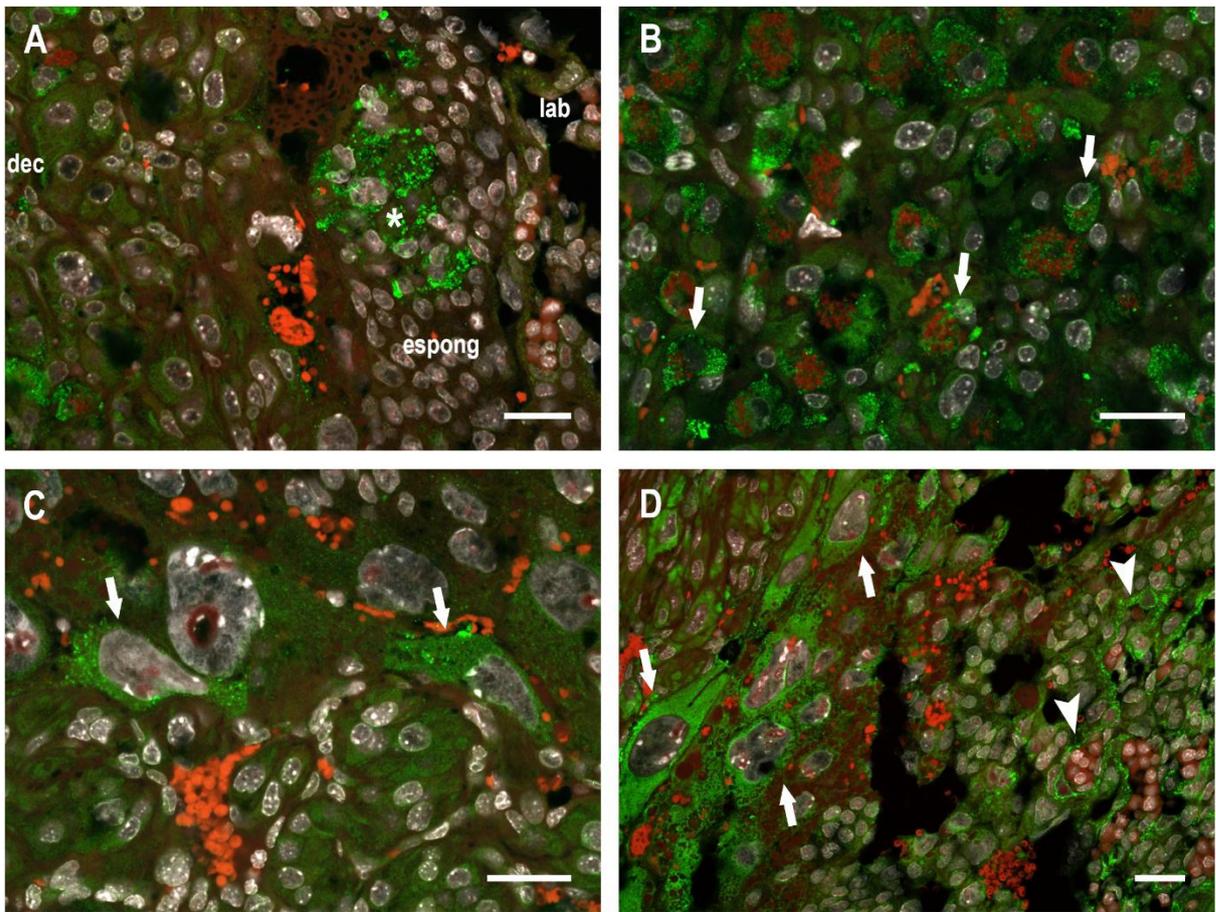


Figura 4.7.3. Imunofluorescência da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg - I. (A, B) Presença de eritropoetina (EPO) no citoplasma de algumas células espongiotrofoblásticas (A: *) e células NK uterinas (B: seta). **(C)** Algumas células trofoblásticas gigantes (CTG) de formato triangular possuem EPO no citoplasma (seta). **(D)** Várias células da placenta expressam fenotipicamente VEGF, principalmente as CTG (seta) e região que fica ao redor dos vasos fetais do labirinto (cabeça de seta). dec: decídua; espong: espongiotrofoblasto; lab: labirinto.

Figs. A-C: SW, 10,5 dg; Verde: EPO Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. D:** SW, 10,5 dg; Verde: VEGF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

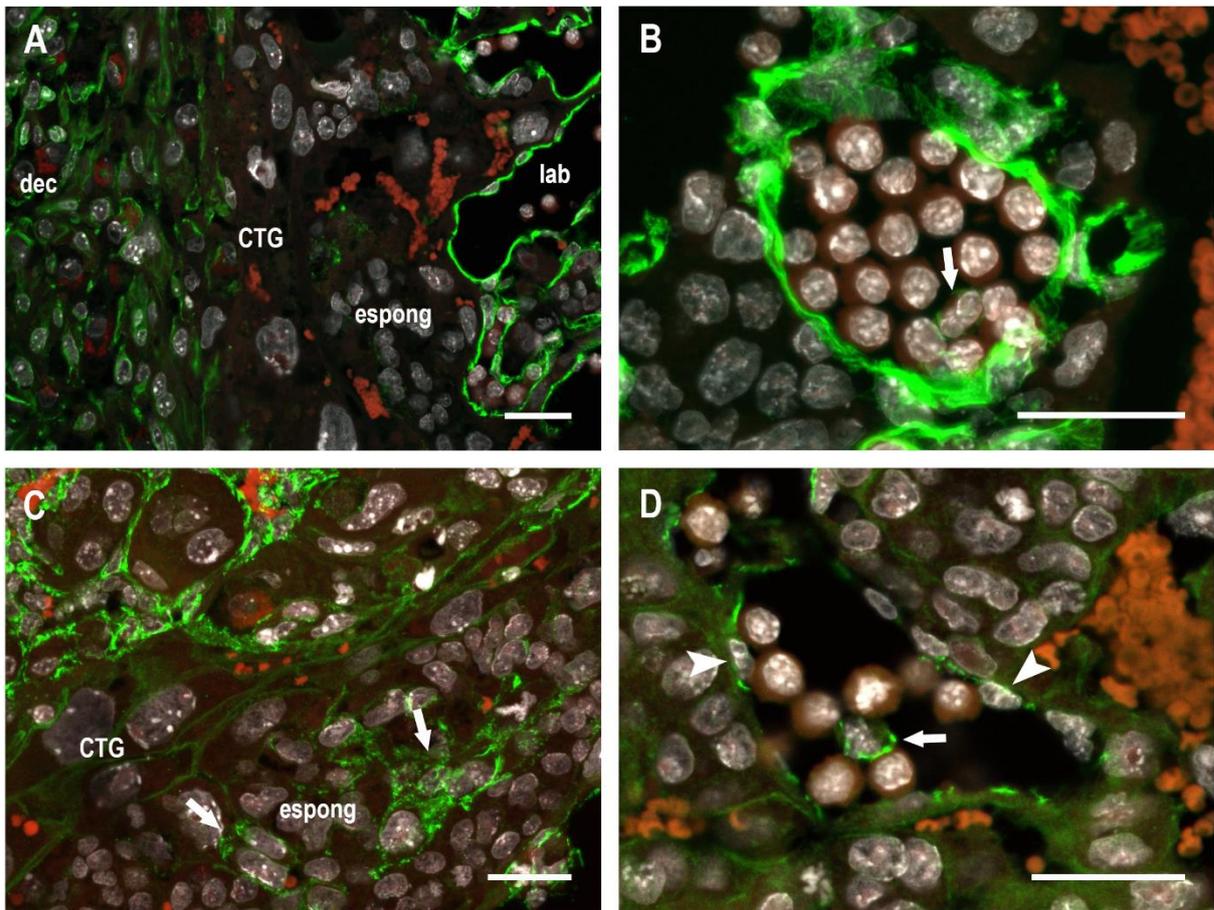


Figura 4.7.4. Imunofluorescência da placenta aos 10,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg - II. (A) Expressão de Vimentina no endotélio dos vasos fetais do labirinto (lab) e algumas células na decídua (dec). (B) Duas células hematopoéticas no interior de um vaso fetal do labirinto expressando fracamente vimentina (seta). (C) Alguns vasos maternos da decídua (dec) positivos para CD31, assim como algumas células espongiotrofoblásticas (espong; seta). (D) Presença da molécula de CD31 em algumas células endoteliais de um vaso fetal do labirinto (cabeça de seta) e em uma célula no lúmen do vaso (seta).

Figs. A, B: SW, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. C, D:** SW, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. A-D:** Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

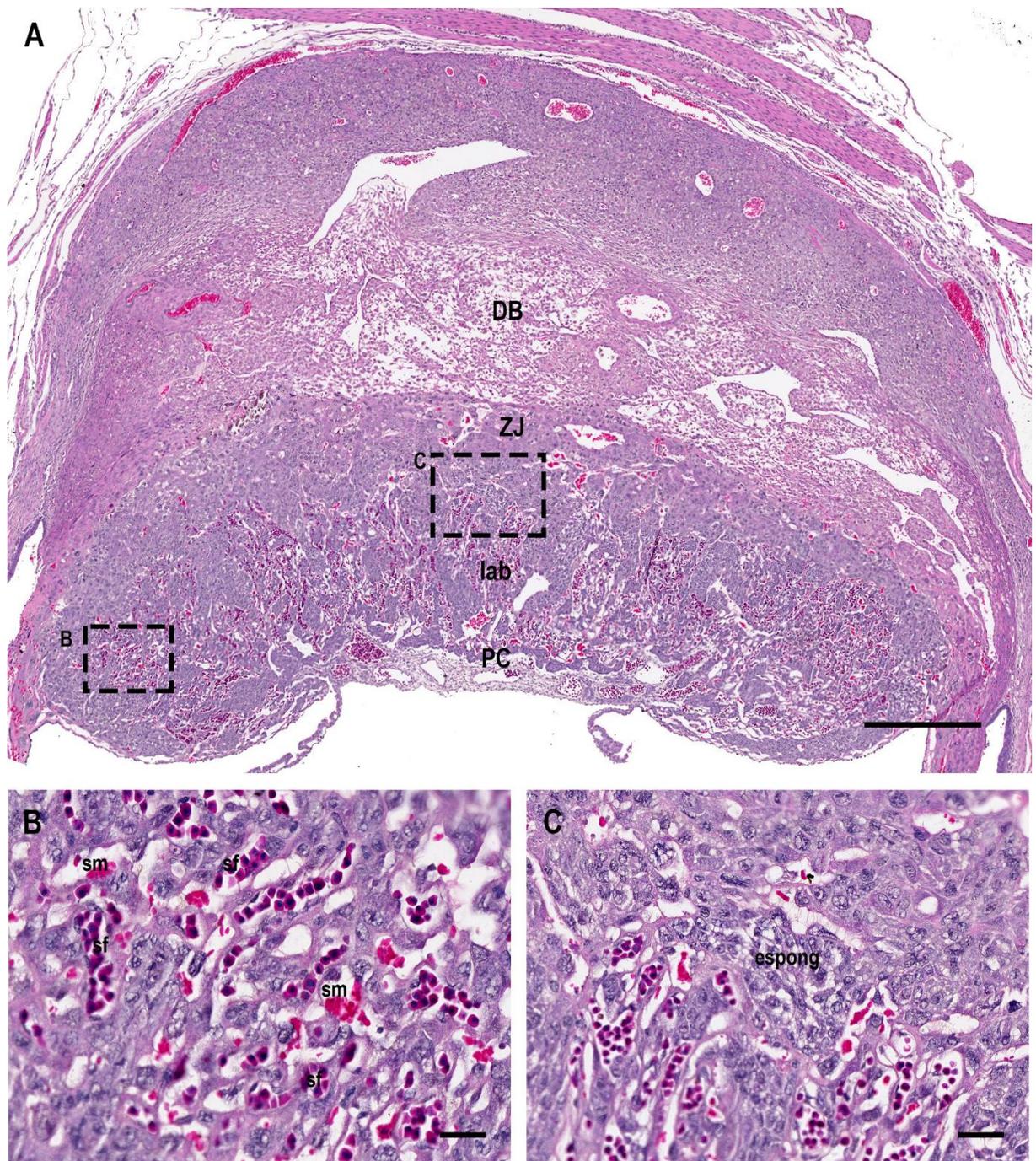


Figura 4.7.5. Placenta de camundongos aos 11,5 dg após a administração de 500 U de rhEPO aos 9,5 dg. (A) Imagem panorâmica da placenta de camundongos aos 11,5 dg após a mãe receber injeção subcutânea de rhEPO aos 9,5 dg. **(B, C)** Labirinto da placenta com vasos contendo sangue fetal (sf) e espaços de sangue materno (sm). A camada de espongiotrofoblasto (espong) é mais espessa nessa idade do desenvolvimento. PC: placa coriônica.

Figs. A-C: SW, 11,5 dg; HE. Microscópio VSlide. Barra A= 500 µm; B, C= 30 µm.

4.8 Transição epitélio-mesenquimal de células espongiotrofoblásticas

Além de estar presente em células endoteliais dos vasos maternos na decídua e dos vasos fetais do labirinto, a vimentina, um marcador de células mesenquimais, foi positiva em algumas células espongiotrofoblásticas da zona de junção que expressavam a proteína Tpbpa (Fig. 4.8.1). Células positivas apenas para Tpbpa coexistiam com células duplo-positivas para Tpbpa e vimentina na zona de junção (Fig. 4.8.1-A, C) e também em raras células espongiotrofoblásticas na região do labirinto (Fig. 4.8.1-B). O fenótipo das células duplo-positivas foi bastante heterogêneo, assim como a intensidade de marcação por vimentina entre as células era diferente. Nelas, a distribuição de vimentina estava restrita à região perinuclear, ou próximo à membrana plasmática ou, ainda, distribuída de forma homogênea em todo citoplasma celular (Fig. 4.8.1-C). Como em uma transição de fenótipo, as células espongiotrofoblásticas que expressavam mais vimentina apresentavam menor expressão de Tpbpa.

Nenhuma célula positiva para Tpbpa ou vimentina, ou para ambos os marcadores, foi encontrada delimitando os espaços de sangue materno do labirinto (Fig. 4.8.1-A). Raras células duplo-positivas foram observadas próximas à circulação materna na decídua (Fig. 4.8.2-A). Algumas células em possível transição epitélio-mesenquimal formaram arranjos sugestivos de diferenciação vascular (Fig. 4.8.2-B-D). Nestes arranjos, células trofoblásticas citoqueratina-8 positivas se organizavam ao redor de uma cavidade, em um arranjo morfológico típico de invaginação/elongação. Algumas células trofoblásticas na periferia da cavidade em formação também expressaram fracamente vimentina (Fig. 4.8.2-C). Tais arranjos foram observados na porção distal do labirinto, na área de transição entre o labirinto e a camada espongiotrofoblástica. Eles estavam próximos a vasos sanguíneos fetais contendo grupos de células vimentina positivas em seu interior (Fig. 4.8.2-B). De fato, o lúmen dos vasos fetais próximos a essa região frequentemente continha células hematopoéticas vimentina positiva (Fig. 4.8.2-E, F) e, às vezes, a expressão de vimentina no endotélio destes vasos mais distais não era contínua (Fig. 4.8.2-F).

Algumas células espongiotrofoblásticas também expressaram o marcador CD31 na periferia (Fig. 4.8.3-A-D). Algumas células do espongiotrofoblasto revelaram ser ainda duplo-positivas para vimentina e o CD31, dois marcadores de células de origem mesenquimal (Fig. 4.8.3-E, F). Enquanto a vimentina apresentou

um padrão de marcação reticulado e difuso por todo o citoplasma, o CD31 foi sempre encontrado na periferia das células duplo-positivas (Fig. 4.8.3-E, F).

Células espongiotrofoblásticas vimentina positivas foram frequentemente encontradas próximo a vasos sanguíneos fetais da região distal do labirinto (Fig. 4.8.4-A-C). Estes vasos muitas vezes continham uma ou mais células hematopoéticas circulantes que também expressavam vimentina (Fig. 4.8.4-C, D). Em algumas placentas, foi possível observar células hematopoéticas expressando fortemente vimentina em vasos mais distais do labirinto e próximos das células espongiotrofoblásticas em transição mesenquimal (Fig. 4.8.4-D); enquanto vasos vizinhos, porém mais afastados da zona de junção, continham células hematopoéticas imaturas expressando fracamente a vimentina na região perinuclear da célula ou células negativa para vimentina (Fig. 4.8.4-E).

Células trofoblásticas foram observadas formando aglomerados de células próximas à zona de junção, cujas células possuíam um ou dois nucléolos salientes quase sempre visíveis (Fig. 4.8.5-A, B). Células semelhantes foram observadas fracamente aderidas entre si e ao estroma adjacente enquanto supostamente adquiriam uma morfologia diferente (Fig. 4.8.5-C). Células hematopoéticas imaturas e de organização nuclear semelhante foram observadas em arranjo morfológico similar, conectadas entre si e ao estroma adjacente, sem estarem envolvidas por uma organização endotelial visível do vaso fetal (Fig. 4.8.5-D). As similaridades morfológicas sugeriram que tais células poderiam ser precursoras de células hematopoéticas imunoblastoides observadas em conjuntos no interior dos vasos fetais (Fig. 4.8.5-E) e/ou de endotélio imunoblastoide hemogênico, de onde as células imunoblastoides poderiam se originar por brotamento (Fig. 4.8.5-F). De fato, diversas vezes foram observadas células hematopoéticas em contato íntimo com células trofoblásticas citoqueratina-8 positivas (Fig. 4.8.6-A, B). Ainda, foram observadas raras células citoqueratina-8 positivas no interior da circulação fetal, cujo núcleo era característico de célula hematopoética (Fig. 4.8.6-C, D).

O anticorpo contra o VEGF estava expresso fenotipicamente em várias células trofoblásticas da placenta. Algumas células espongiotrofoblásticas, CTG e algumas células trofoblásticas da região do labirinto (Fig. 4.8.7-A, B, C) expressaram esse fator. O VEGF também foi positivo em algumas células da circulação fetal (Fig. 4.8.7-C-F), incluindo células que também expressaram vimentina (Fig. 4.8.7-D-F).

Para entender e acompanhar a transição epitélio-mesenquimal das células espongiotrofoblásticas, foram analisadas placentas de camundongos SW em outras idades gestacionais. Aos 9,5 dg, havia menos células Tpbpa positivas na zona de junção e nenhuma célula na região de labirinto. Foram encontradas áreas de células Tpbpa positivas que não expressavam vimentina (Fig. 4.8.8-A). Em outras áreas, próximas ou não do labirinto, foi possível observar células Tpbpa positivas próximas a células duplo-positivas que expressavam fracamente a vimentina (Fig. 4.8.8-B, C, D). No entanto, em algumas placentas com 9,5 dg foram encontradas células Tpbpa positivas que expressavam fortemente a vimentina, as quais encontravam-se bem próximas aos vasos fetais do labirinto (Fig. 4.8.8-E, F), vasos estes que às vezes continham células hematopoéticas circulantes vimentina positivas (Fig. 4.8.8-F). É importante ressaltar que algumas células endoteliais de vasos do labirinto possuem formato globoso e não o típico aspecto fusiforme (Fig. 4.8.8-F).

Aos 12,5 dg, a zona de junção apresentou-se mais espessa e foi possível ver células espongiotrofoblásticas Tpbpa positivas projetando-se desta região em direção do labirinto (Fig. 4.8.9-A). Às vezes, foi possível observar a expressão fraca de vimentina na periferia de algumas células Tpbpa positivas (Fig. 4.8.9-B, C, D). Nessa idade, algumas células espongiotrofoblásticas expressaram a proteína Tpbpa mais intensamente (4.8.9-E). Um pouco mais tarde no desenvolvimento, aos 14,5 dg, as células espongiotrofoblásticas expressaram fortemente Tpbpa mas foram negativas para vimentina (Fig. 4.8.10-A, B, C).

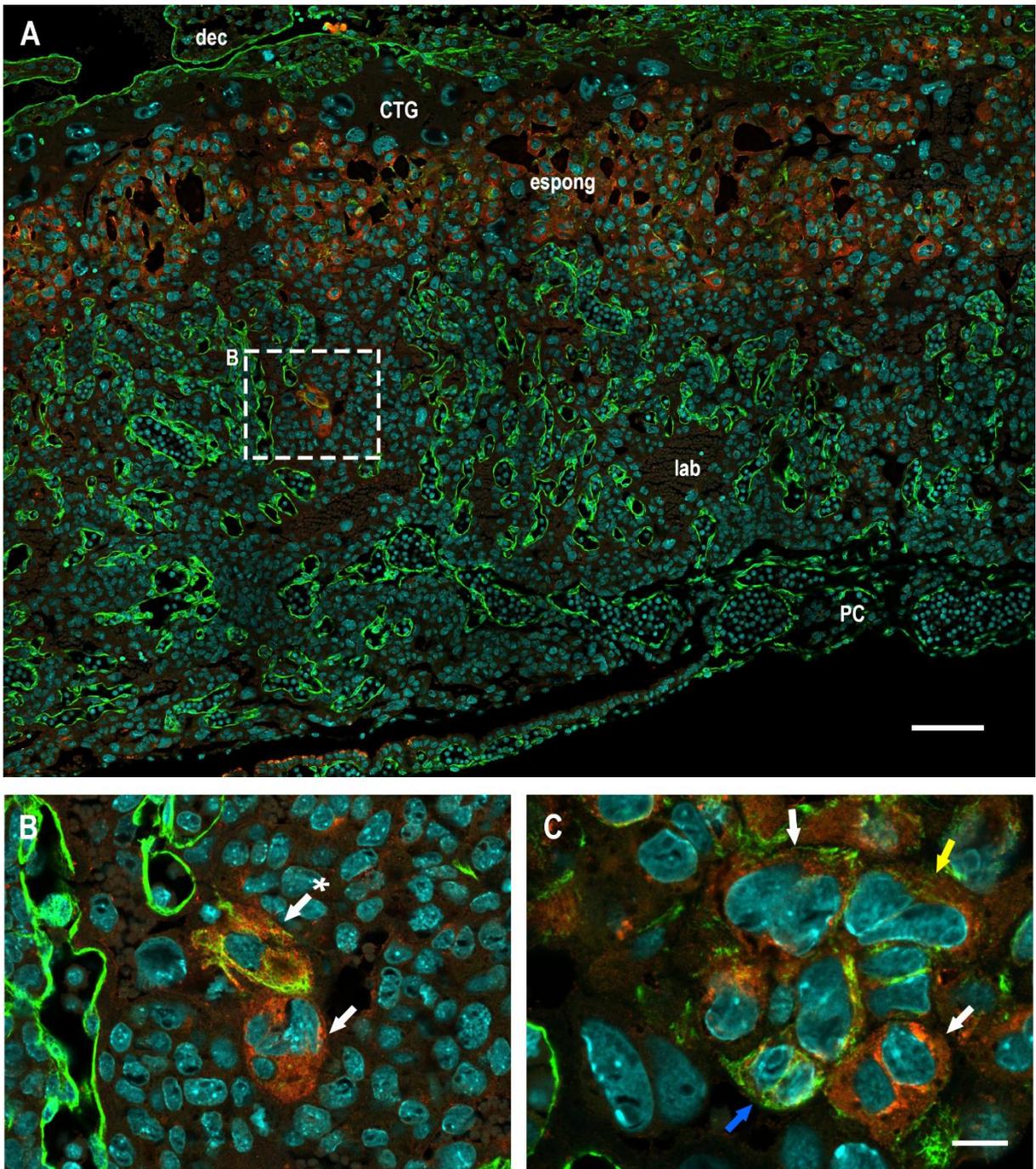


Figura 4.8.1. Detecção de Vimentina em células espongiofoblásticas reveladas pela expressão de Tpbpa. (A) Todas as células da camada espongiofoblástica (espong) expressam Tpbpa. Algumas células Tpbpa⁺ também são observadas em meio a células trofoblásticas do labirinto (lab). A vimentina está presente nas células endoteliais dos vasos fetais da placa coriônica (PC), labirinto, e decidua (dec). É possível observar algumas células que expressam tanto Tpbpa quanto vimentina na zona de junção e também no labirinto (retângulo). (B) Duas células grandes expressando Tpbpa no labirinto (seta), em que uma delas também expressa vimentina (*). (C) Heterogeneidade nas células duplo-positivas da zona de junção. Algumas células expressam fortemente Tpbpa e possuem apenas alguns filamentos de vimentina na periferia (seta branca). Outra célula com pouca quantidade de vimentina mas na região perinuclear (seta amarela). Outras células Tpbpa⁺ com muita vimentina por todo o citoplasma (seta azul). As células duplo-positivas são também heterogêneas em tamanho e arranjo nuclear, com algumas células exibindo núcleo bilobado/ dois núcleos.

Figs. A-C: B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. Confocal LSM 710. Barra A= 100 µm; C= 10 µm.

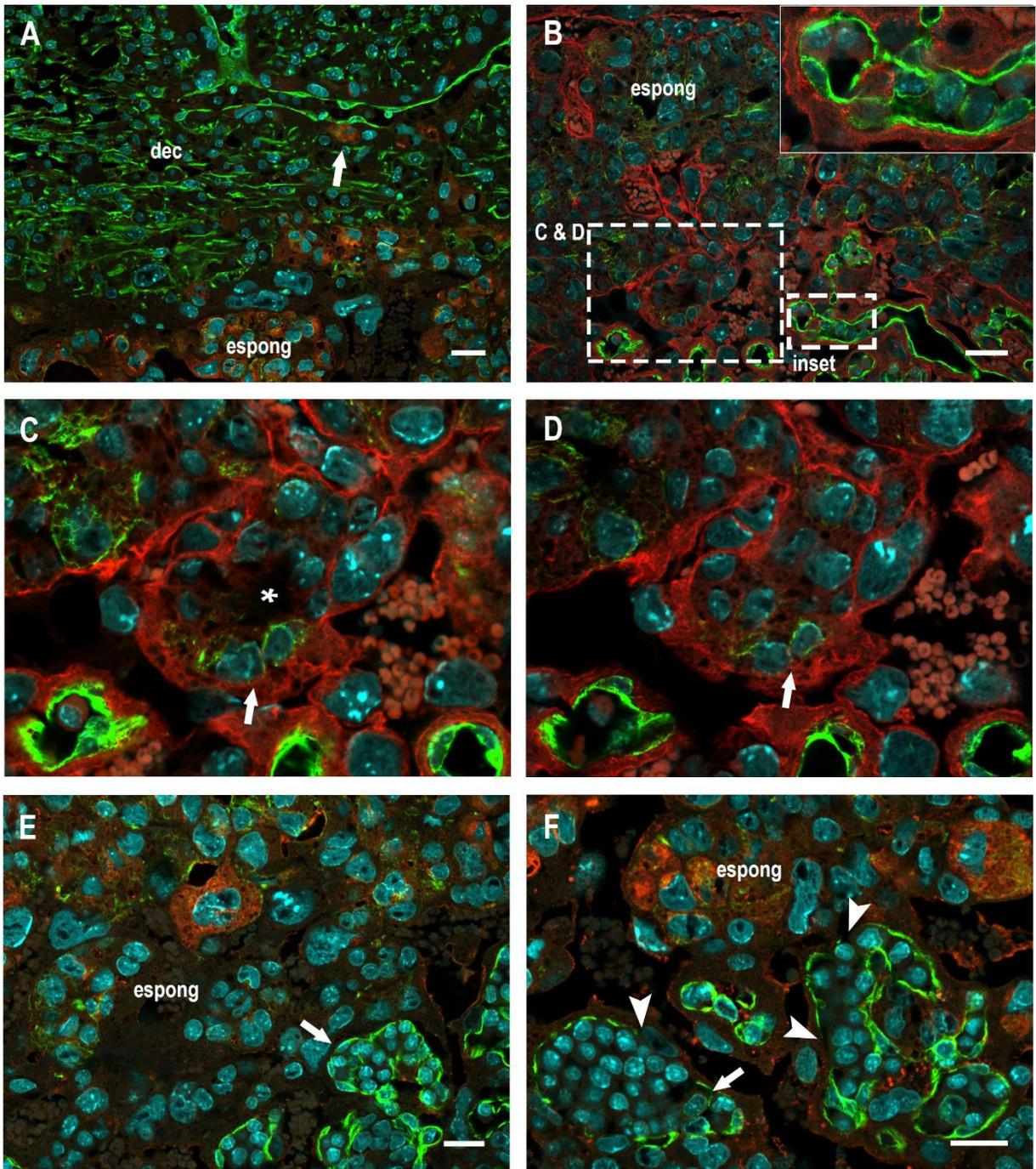


Figura 4.8.2. Detecção de Vimentina. (A) Raras células na decídua (dec) expressam Tpbpa e vimentina (seta). (B-D) Arranjos sugestivos de formação tubular por células espongiotrofoblásticas da zona de junção (espong) próximas ao labirinto (lab). Nestes, duas células duplo-positivas para citoqueratina-8 e Vimentina se organizam na periferia do arranjo (C, D: setas) que contém uma cavidade no interior (D: *). Um vaso fetal do labirinto próximo a esse arranjo possui numerosas células vimentina positivas no seu interior (B: *inset*). (E, F) Outros vasos próximos à camada de células espongiotrofoblásticas duplo-positivas para Tpbpa e vimentina contém células que expressam vimentina em seu interior (setas).

Figs. A, E, F: B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Figs. B-D:** B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Figs. A-F:** Confocal LSM 710. Barra A, B= 30 µm; E, F= 20 µm.

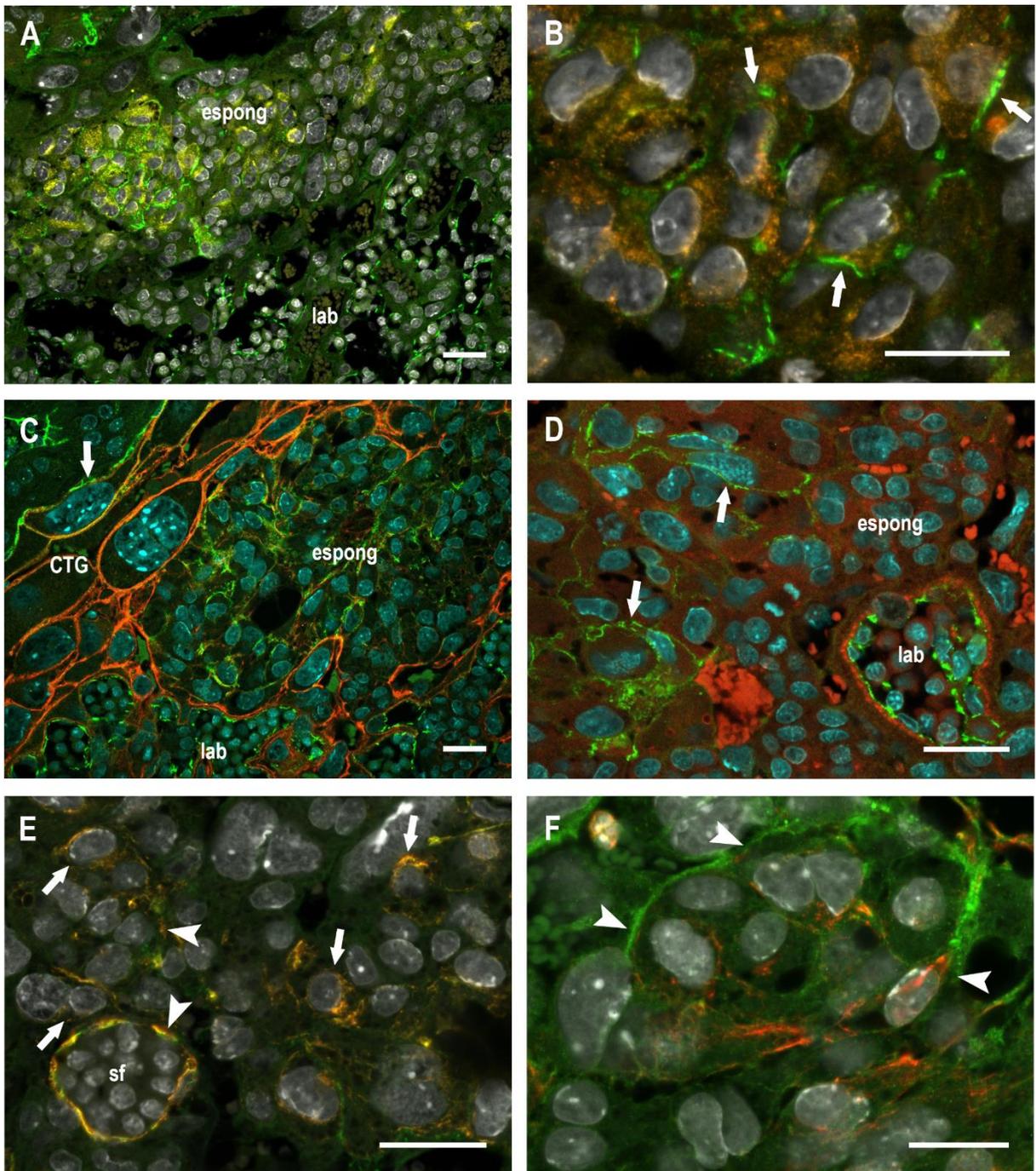


Figura 4.8.3. Detecção de Vimentina e CD31 na zona de junção. (A, B) Células da camada espongiotrofoblásticas (espong) expressam Tpbpa e algumas delas também expressam CD31 na periferia (setas). (C, D) Algumas células trofoblásticas gigantes (CTG) também expressam CD31 na periferia celular (setas). (E, F) Quando submetidas à dupla-marcação com Vimentina e CD31, algumas células espongiotrofoblásticas expressam filamentos de vimentina de forma difusa no citoplasma e CD31 na periferia (cabeça de seta). Algumas células espongiotrofoblásticas são positivas apenas para vimentina (seta). lab: labirinto.

Figs. A, B: SW, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Figs. B, C:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Troma TRITC, ciano: DAPI. **Figs. D, E:** B6, 10,5 dg; Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Figs. A-F:** Confocal LSM 710. Barra A, C-E= 30 µm; B, F= 20 µm.

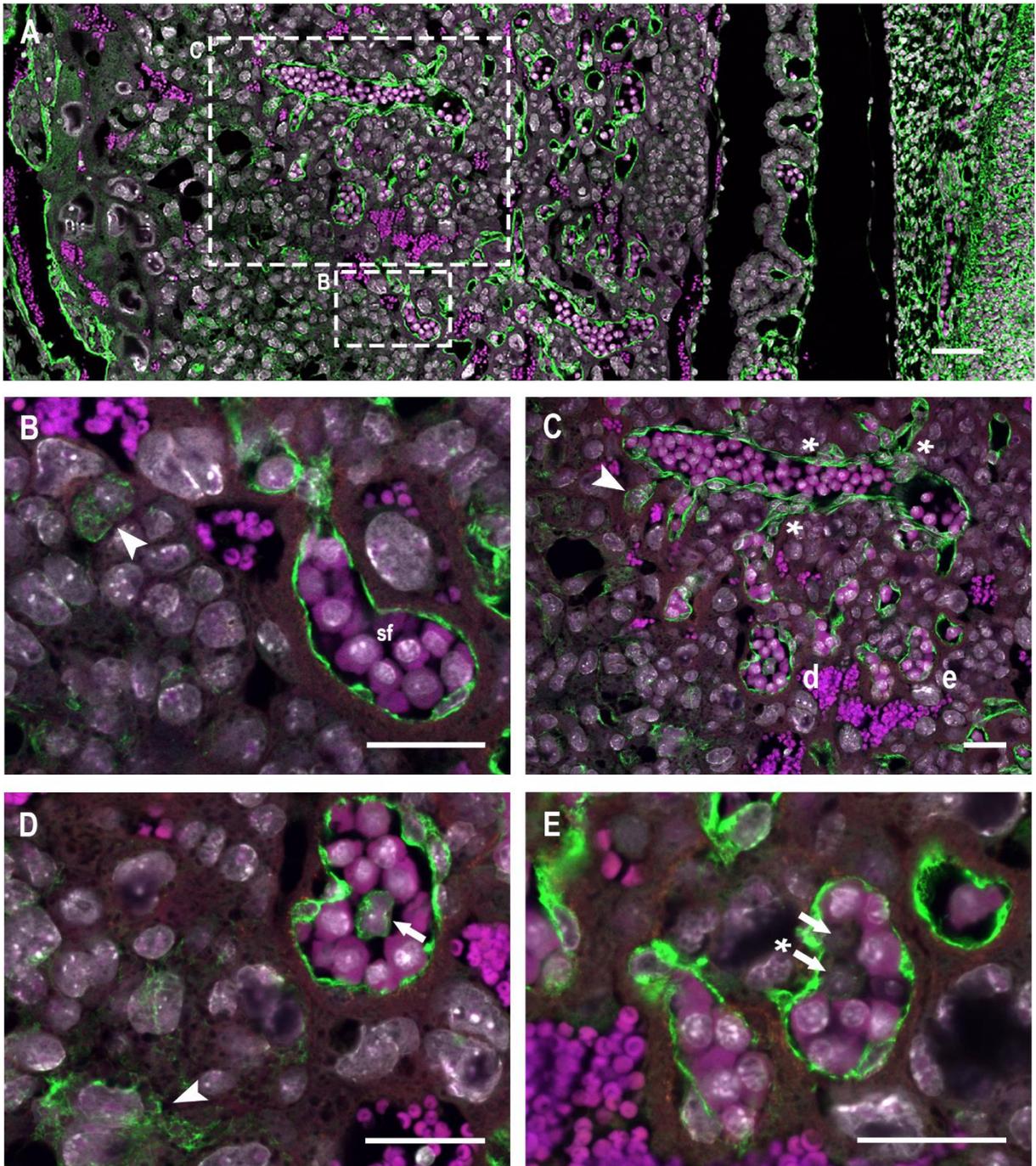


Figura 4.8.4. Distribuição espacial de vimentina: do espongiotrofoblasto até células hematopoéticas do labirinto. (A) Imagem panorâmica de uma porção da placenta de camundongos mostrando as regiões recortadas para arranjos em maior aumento. (B, C) Células na camada espongiotrofoblástica expressando vimentina próxima a vasos fetais do labirinto (cabeça de seta). Células na parede do vaso fetal são globosas e vimentina positivas (C: *). (D) Detalhe da imagem C, mostrando uma célula imatura no vaso fetal expressando vimentina (seta). Células espongiotrofoblásticas com filamentos de vimentina também presentes nessa imagem (cabeça de seta). (E) Outro detalhe da imagem C, mostrando duas células imunoblastoides no sangue fetal (sf). Uma célula expressa fracamente vimentina na região perinuclear (*) enquanto a outra célula é negativa.

Figs. A-E: B6, 10,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 635, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra A=60µm; B-E= 30 µm.

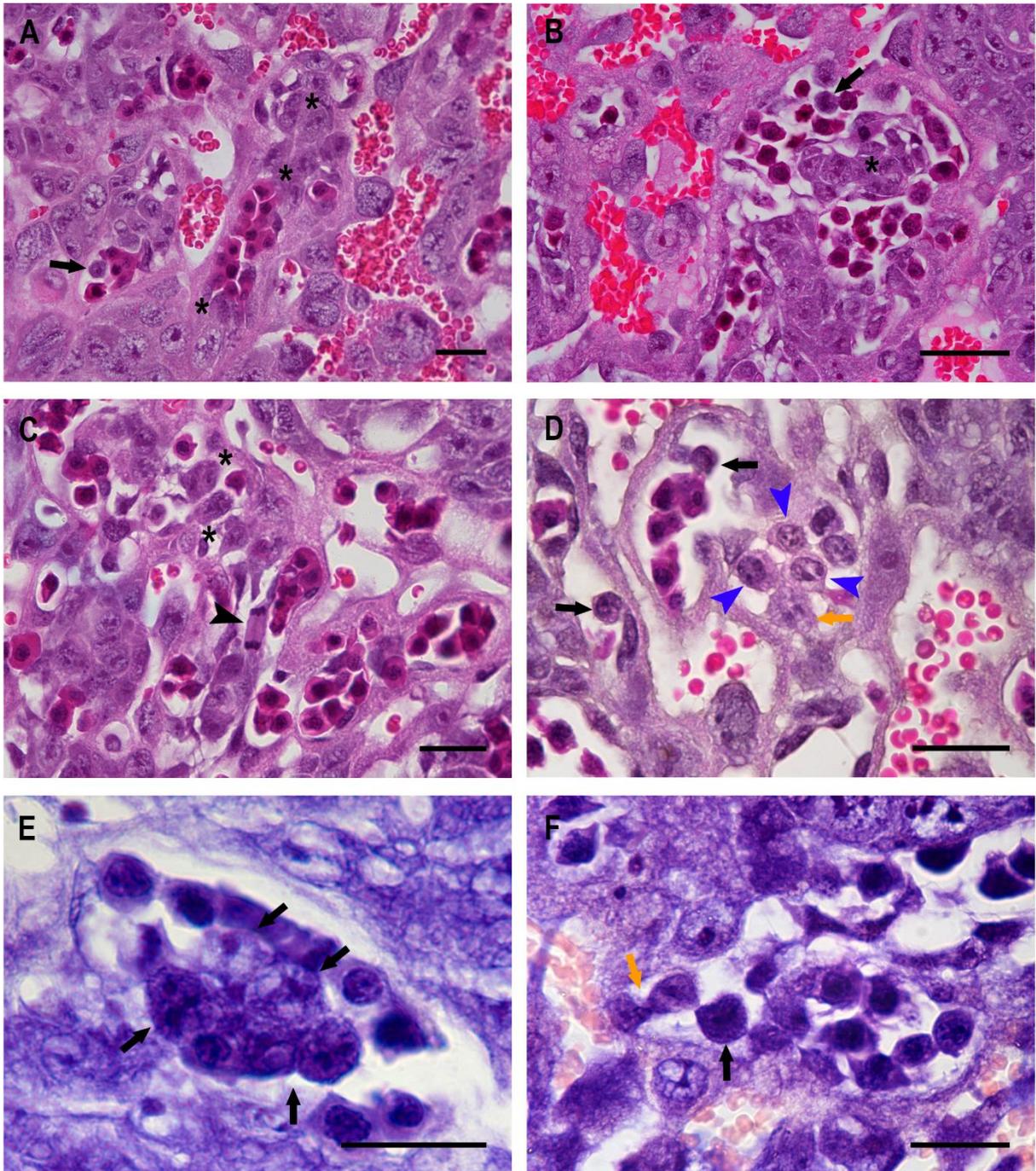


Figura 4.8.5. Sequência morfológica de diferenciação hematopoética. (A, B) Células trofoblásticas com um ou dois nucléolos salientes formando aglomerados de células próximos a vasos fetais do labirinto (*). Algumas células hematopoéticas imaturas estão presentes em vasos fetais próximos (setas). **(C)** Grupos de células trofoblásticas semelhantes contém células fracamente aderidas entre si e ao estroma adjacente por prolongamentos citoplasmáticos (*). Mitose de célula trofoblástica (cabeça de seta). **(D)** Células hematopoéticas grandes, com núcleo reticulado e vários nucléolos salientes encontram-se aderidas entre si (seta azul) e ao vaso adjacente (seta laranja), o qual não possui organização endotelial perceptível. Células hematopoéticas imaturas basofílicas são presentes em vasos sanguíneos próximos (seta preta). **(E)** Aglomerado de células hematopoéticas grandes, com núcleo reticulado e vários nucléolos salientes encontram-se no lúmen de um vaso aparentemente com endotélio descontínuo (setas). **(F)** Célula endotelial imunoblastoide aderida a uma célula morfológicamente semelhante brotando para o lúmen do vaso fetal (seta laranja).

Figs. A-C: SW, 10,5 dg; HE. **Fig. D:** B6, 10,5 dg; HE. **Figs. E, F:** SW, 10,5 dg; HE. Barra= 20 µm.

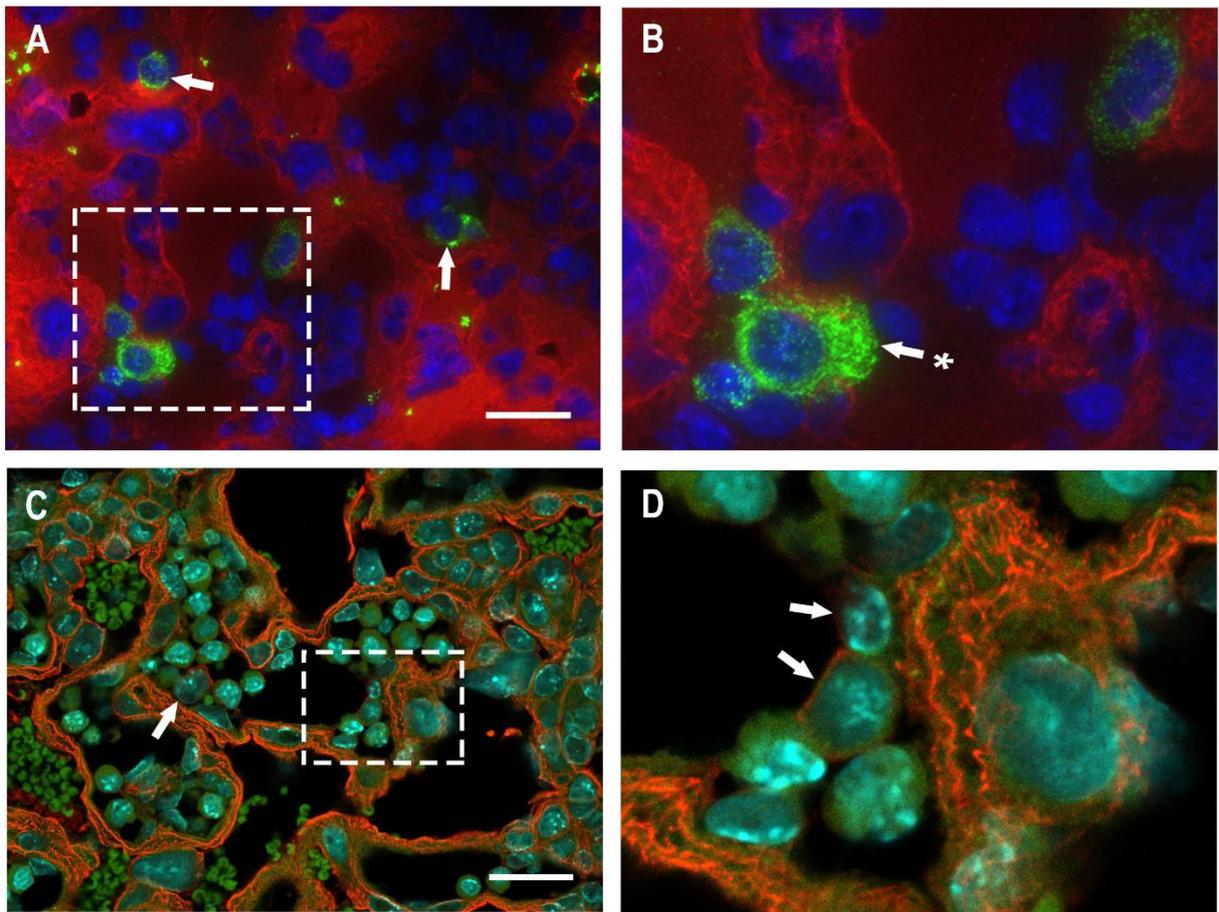


Figura 4.8.6. Células hematopoéticas e trofoblásticas. (A-B) Células sanguíneas que expressam vWF (seta) em contato direto com células trofoblásticas adjacentes (*). **(C-D)** Algumas células no interior da circulação fetal expressam citoqueratina 8.

Figs. A-B: B6, 10,5 dg; Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: Troma Alexa Fluor 594, azul: DAPI. Microscópio de fluorescência Axiovert M1. **Figs. C-D:** B6, 10,5 dg; vermelho: citoqueratina-8 Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

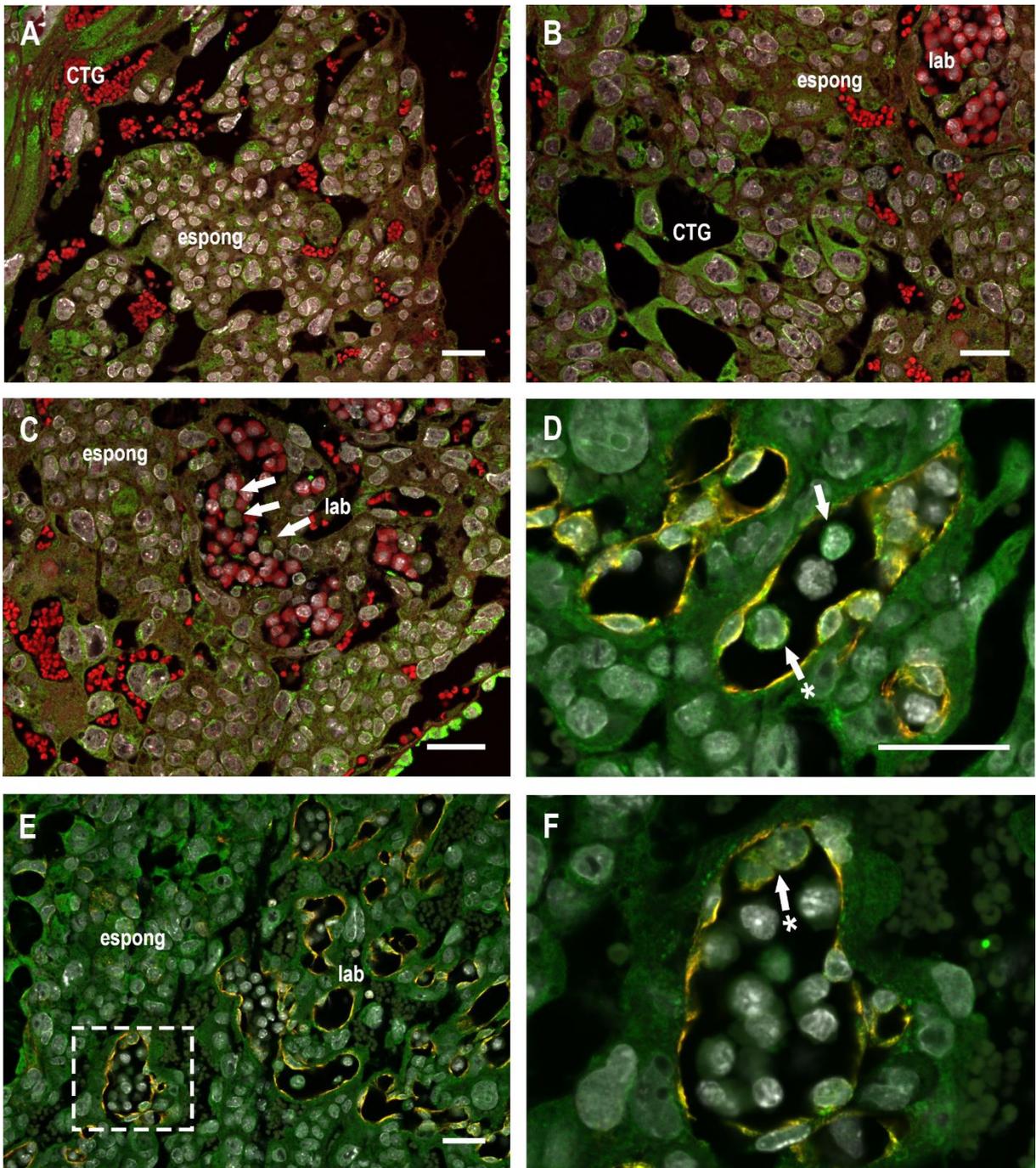


Figura 4.8.7. Expressão de VEGF. (A-C) O VEGF é amplamente expresso em várias células trofoblástica da placenta. Algumas células espongiotrofoblásticas (espong), células trofoblásticas gigantes (CTG) e células trofoblásticas do labirinto (lab). Algumas células no interior do vaso fetal também expressam VEGF (C: seta). **(D-F)** Células circulantes positivas para VEGF estão distribuídas nos vasos fetais de todo o labirinto (seta) e algumas também expressam filamentos de vimentina (*).

Figs. A-C: B6, 10,5 dg; Verde: VEGF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. D-F:** B6, 10,5 dg; Verde: VEGF Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Figs. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

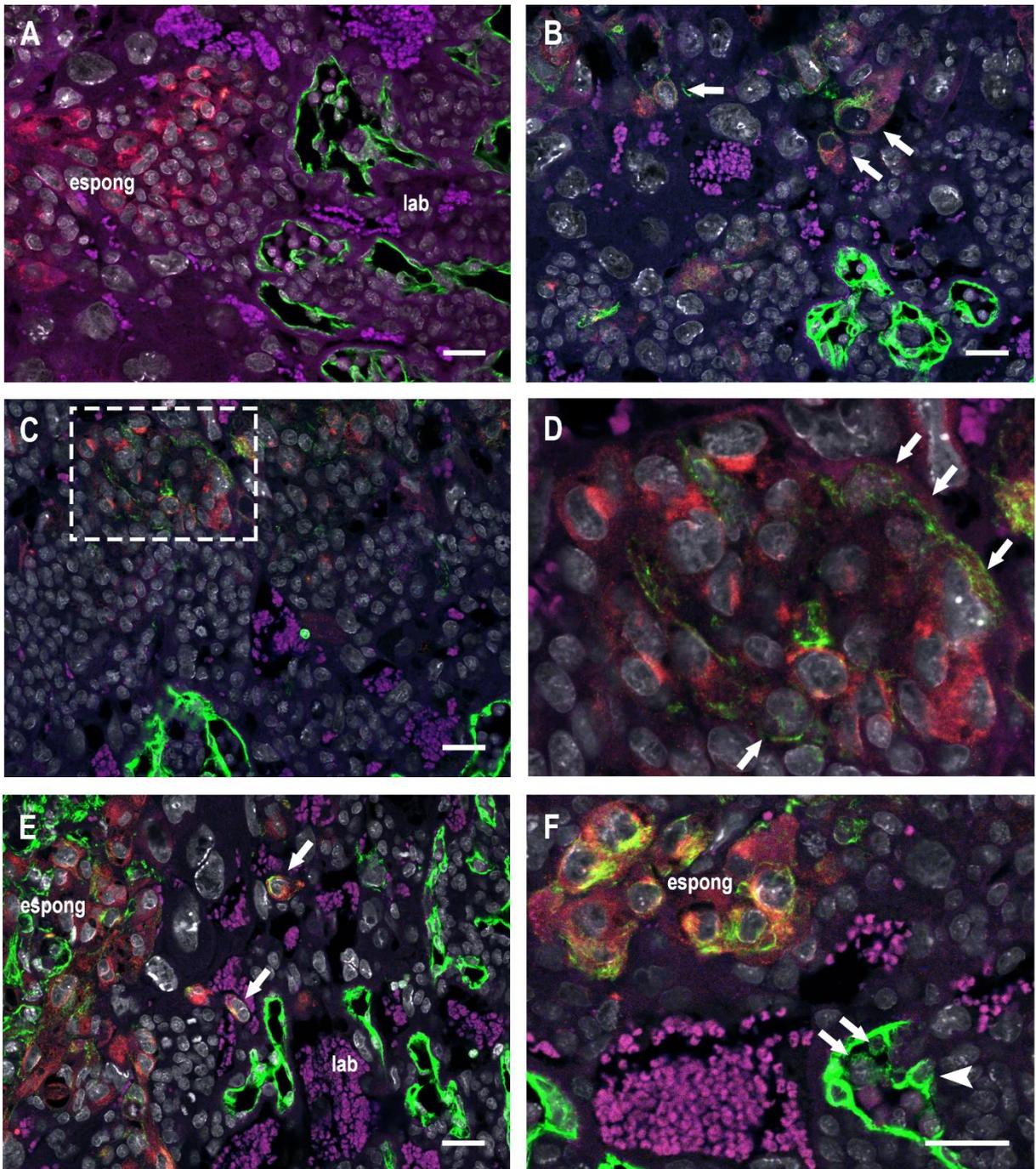
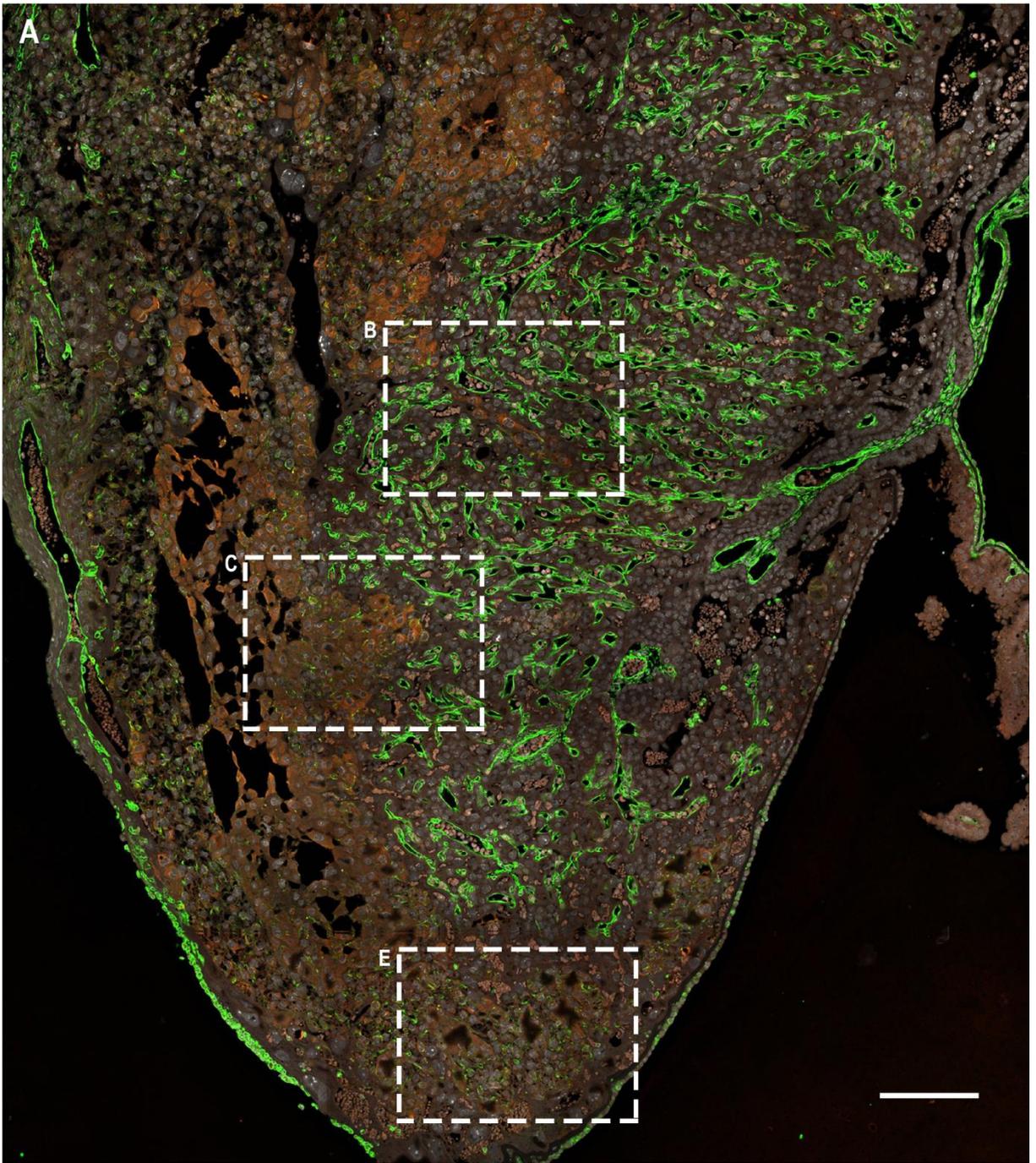


Figura 4.8.8. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 9,5 dg. (A) Camada de células espongiotrofoblásticas detectadas pela presença de Tpbpa. (B-E) Algumas células Tpbpa também expressam vimentina (seta). (F) Conjunto de células espongiotrofoblásticas duplo-positivas para Tpbpa e vimentina próximas a um vaso fetal do labirinto. Este vaso possui célula endotelial globosa (cabeça de seta) e duas células hematopoéticas no lúmen (setas).

Figs. A-C: SW, 9,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 30 μ m.



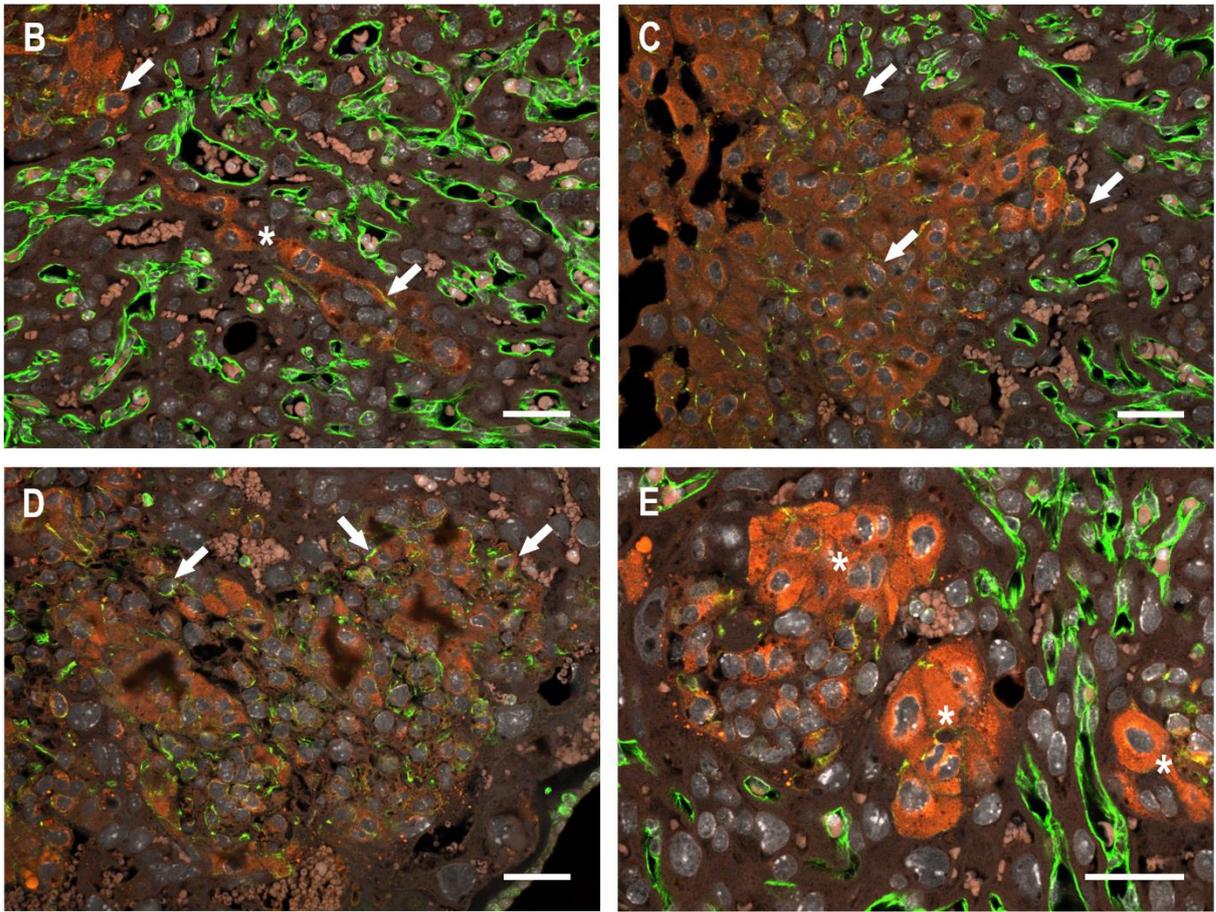


Figura 4.8.9. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 12,5 dg. (A) Camada de células espongiotrofoblásticas detectadas pela presença de Tpbpa. **(B)** No maior aumento é possível observar que o espongiotrofoblasto penetra no labirinto (*) e possui raras células que expressam vimentina na periferia (seta). **(C, D)** Outras células Tpbpa positivas expressando fracamente vimentina na periferia celular (seta). **(E)** Algumas células expressam intensamente Tpbpa em todo o citoplasma (*).

Figs. A-C: SW, 12,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 150 µm, B-E= 40 µm.

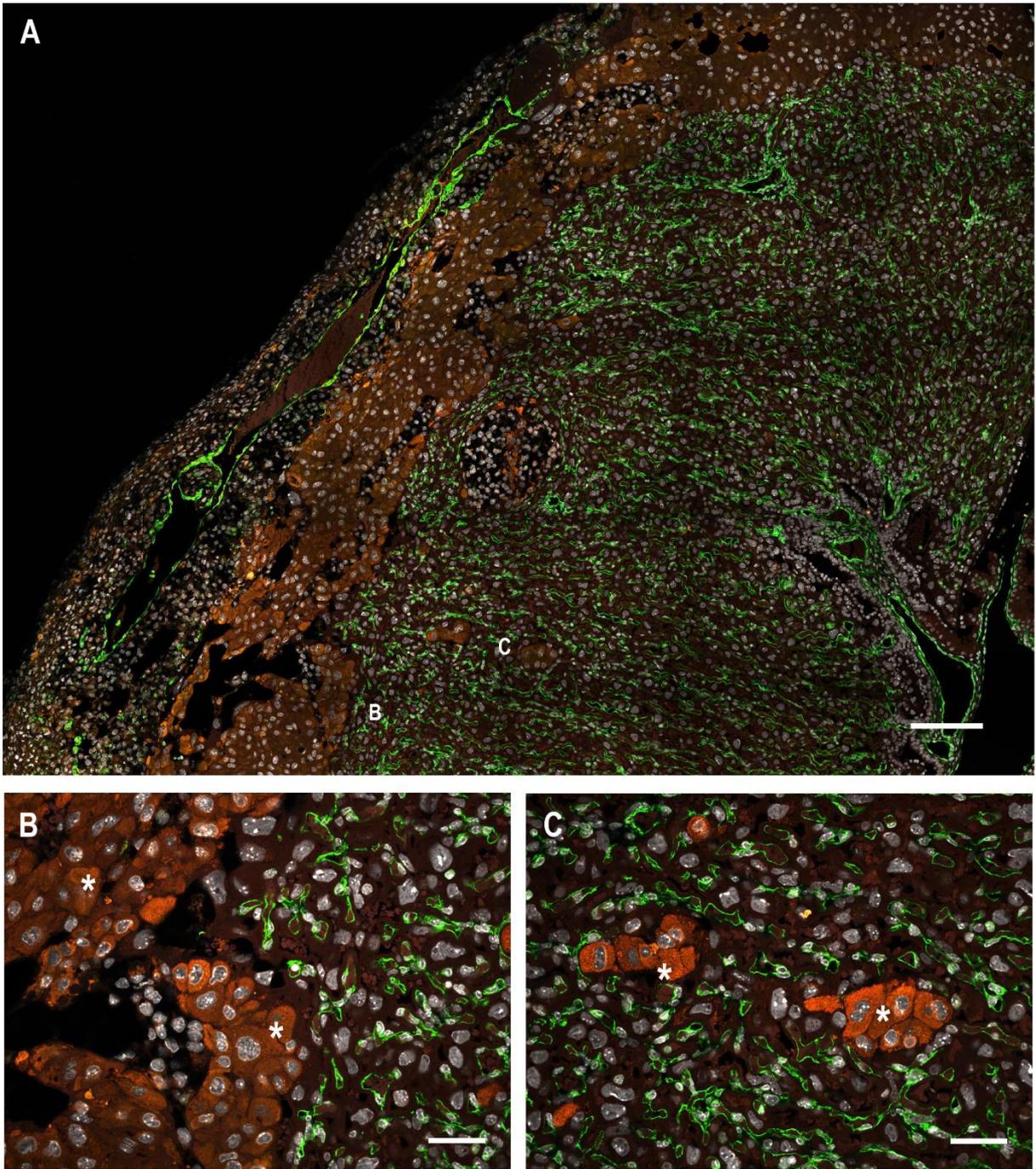


Figura 4.8.10. Detecção de Tpbpa e vimentina na placenta murina com 14,5 dg. (A) A camada espongiotrofoblástica é detectada pela presença de Tpbpa (vermelho). O labirinto consiste na maior parte da placenta e pode ser visualizado pela intensa vascularização evidenciada pela marcação endotelial vimentina (verde) (B-C) O maior aumento das células espongiotrofoblásticas da zona de junção (B) e daquelas que invaginam para o labirinto (C) revela a forte expressão de Tpbpa no citoplasma destas células (*).

Figs. A-C: SW, 14,5 dg; Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra A= 150 μ m; B, C= 40 μ m.

4.9 Importância do PGF na vasculogênese no labirinto da placenta

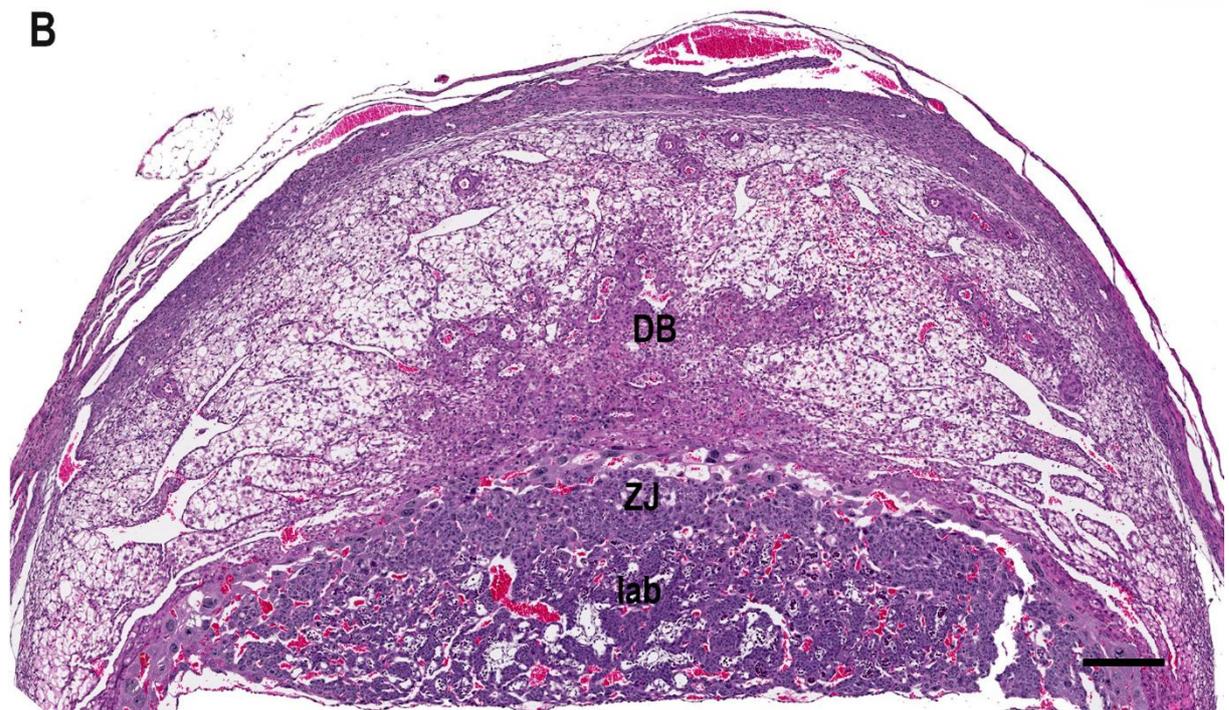
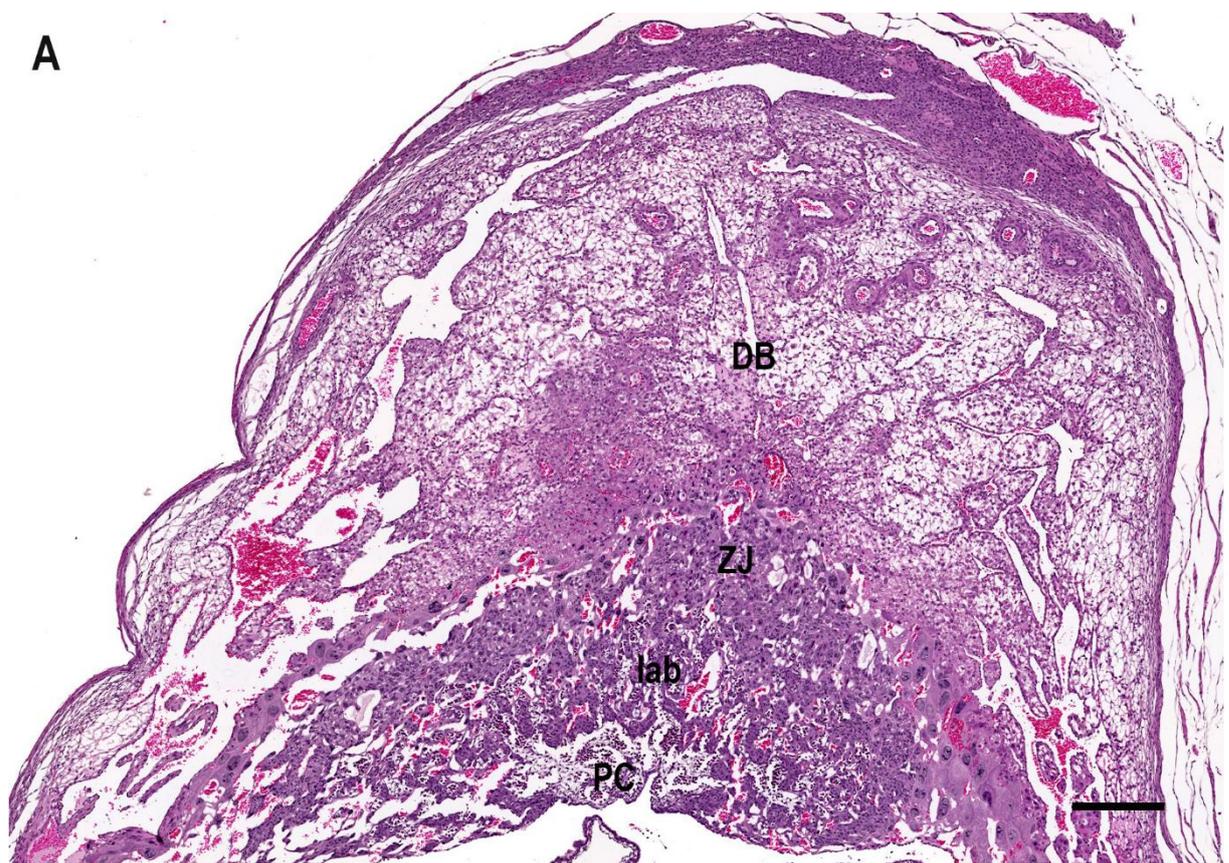
A morfologia das placentas de camundongos *Pgf^{-/-}* variou bastante entre os sítios implantacionais de fêmeas com 10,5 dg. Todas as placentas pareciam ter algum grau de alteração morfológica nas regiões da placenta, seja na espessura e composição da zona de junção ou na invasão decidual ou nos vasos do labirinto (Fig. 4.9.1). Devido à grande diversidade morfológica encontrada, não foi possível medir a espessura e tamanho dos vasos fetais do labirinto para achar um padrão de alteração vascular nessa região que pudesse ser relacionado à ausência desse fator. Em apenas um dos sítios implantacionais analisados, foi observado um grande número de células apoptóticas na porção final de vasos que se infiltravam no interior do labirinto a partir da placa coriônica (Fig. 4.9.2-A, B).

Em todos os sítios, entretanto, foram observadas uma quantidade relativamente maior de células hematopoéticas imaturas, normalmente observadas em grupos de células. Algumas células hematopoéticas encontradas foram fortemente basofílicas (Fig. 4.9.2-C) ou possuíam núcleo bilobado ou duplo (Fig. 4.9.2-D). Entretanto, as células imunoblastoides foram as células hematopoéticas imaturas mais frequentes em camundongos *Pgf^{-/-}*, contendo células aparentemente aderidas umas às outras, e às vezes formando *clusters* (Fig. 4.9.2-D-F). A heterogeneidade das células pôde ser melhor visualizada por imunohistoquímica realizada com o anticorpo anti-CD41, revelando a presença de células de diferentes tamanhos e arranjos nucleares, bem como diferentes intensidades de expressão de CD41 (Fig. 4.9.3). O número de células CD41 positivas no labirinto das placentas de camundongos *Pgf^{-/-}* foi quase duas vezes maior do que a quantidade de células CD41 dos camundongos controle B6 (Fig. 4.9.3-E).

Tanto camundongos *Pgf^{-/-}* quanto B6 expressaram fortemente CD71 na região de labirinto da placenta, possivelmente no sinciciotrofoblasto (Fig. 4.9.4-A-F). Células de morfologia eritroblastoide em ambas as linhagens foram CD71⁺ (Fig. 4.9.4-A-F). Entretanto, os eritroblastos dos camundongos B6 foram frequentemente observados em *clusters* principalmente nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção (Fig. 4.9.4-A, E) enquanto raros clusters eritropoéticos foram observados nos camundongos *Pgf^{-/-}*. Além disso, apenas os camundongos B6 apresentaram uma fraca marcação citoplasmática em algumas células do espongiotrofoblasto (Fig. 4.9.A, C).

A imunofluorescência revelou que as células espongiotrofoblásticas de camundongos *Pgf^{-/-}* expressavam Tpbpa (Fig. 4.9.4-A) e vimentina (Fig. 4.9.4-B) com menor intensidade do que camundongos controle. Ainda assim, foi possível observar células duplo-positivas para esses dois marcadores em algumas áreas da zona de junção (Fig. 4.9.4-C). O CD31 foi raramente expresso por células espongiotrofoblásticas (Fig. 4.9.4-D), mesmo naquelas fracamente positivas para vimentina (Fig. 4.9.4-E). O VEGF continuou sendo amplamente expresso na placenta, principalmente nas CTG, as quais foram fortemente positivas (Fig. 4.9.4-F).

Os vasos fetais das placentas *Pgf^{-/-}* com 10,5 dg, exibiram o mesmo padrão de marcação nas células endoteliais para CD31 (Fig. 4.9.5-A). Entretanto, algumas células no interior de vasos fetais próximos à zona de junção também continham células hematopoéticas circulantes CD31 positivas (Fig. 4.9.5-A, B). Como nos camundongos controle, a vimentina exibiu um padrão de marcação mais intenso nos vasos fetais do labirinto (Fig. 4.9.5-C, D). Clusters de células vimentina positivas também foram observados em vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção (Fig. 4.9.5-E, F). Além de células hematopoéticas CD31 ou vimentina positivas, foram encontradas células hematopoéticas CD41 positivas nos camundongos *Pgf^{-/-}* (Fig. 4.9.6-A, B, C, D, E, F), ou ainda, células duplo-positivas para os marcadores CD41 e vimentina (Fig. 4.9.6-B, C, D) ou CD41 e vWF (Fig. 4.9.6-E, F).



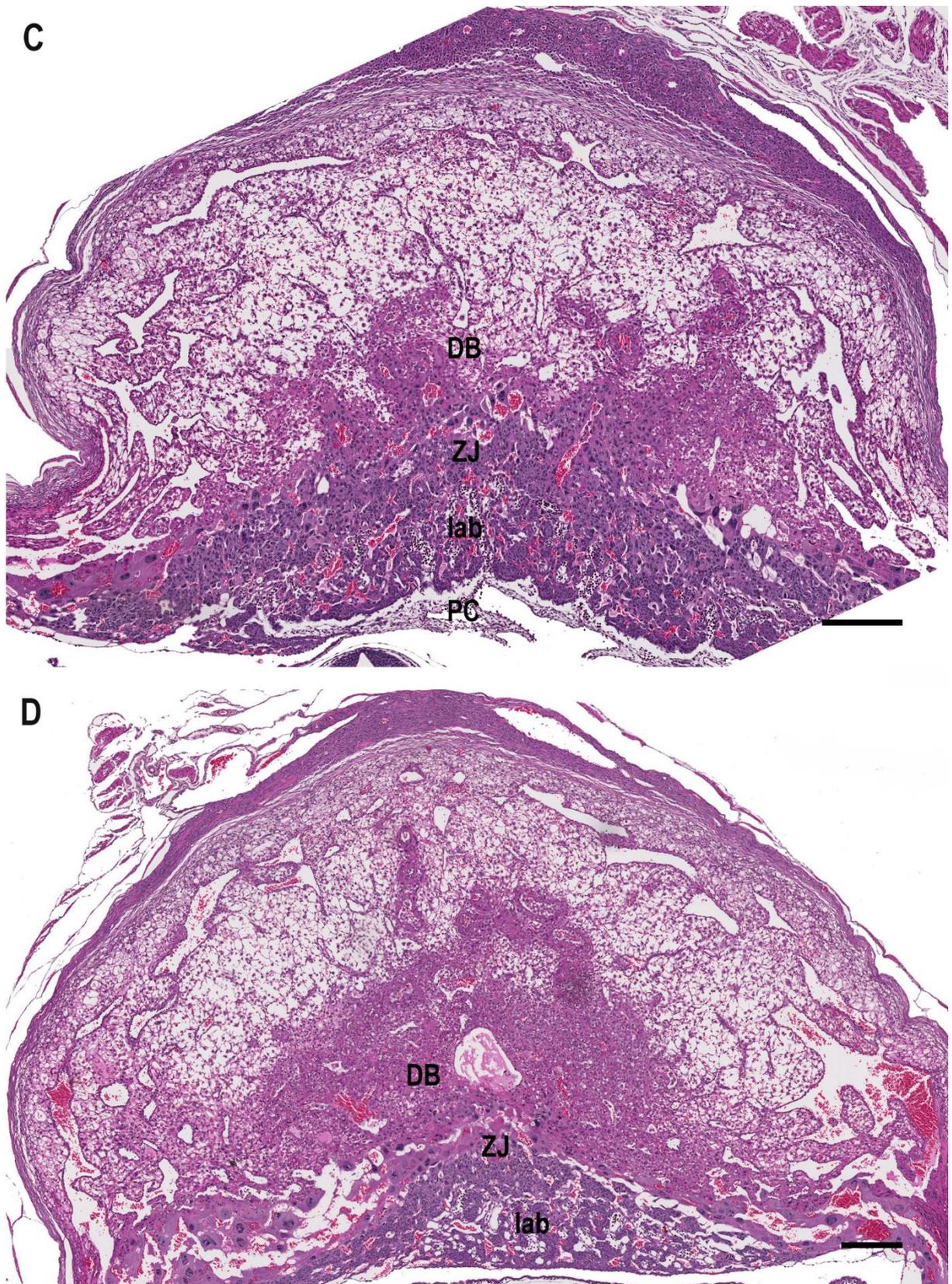


Figura 4.9.1. Placentas de camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf^{-/-}*). (A-D) Imagem panorâmica da placenta de camundongos *Pgf^{-/-}* aos 10,5 dg. Em todas as imagens é possível distinguir as camadas básicas da placenta: decidua basal (DB), zona de junção (ZJ) que é composta por uma camada de células trofoblásticas gigantes (CTG) e uma camada de células espongiotrofoblásticas (espong), e o labirinto (lab).

Figs. A-C: *Pgf^{-/-}*, 10,5 dg; HE. Barra= 300 μ m.

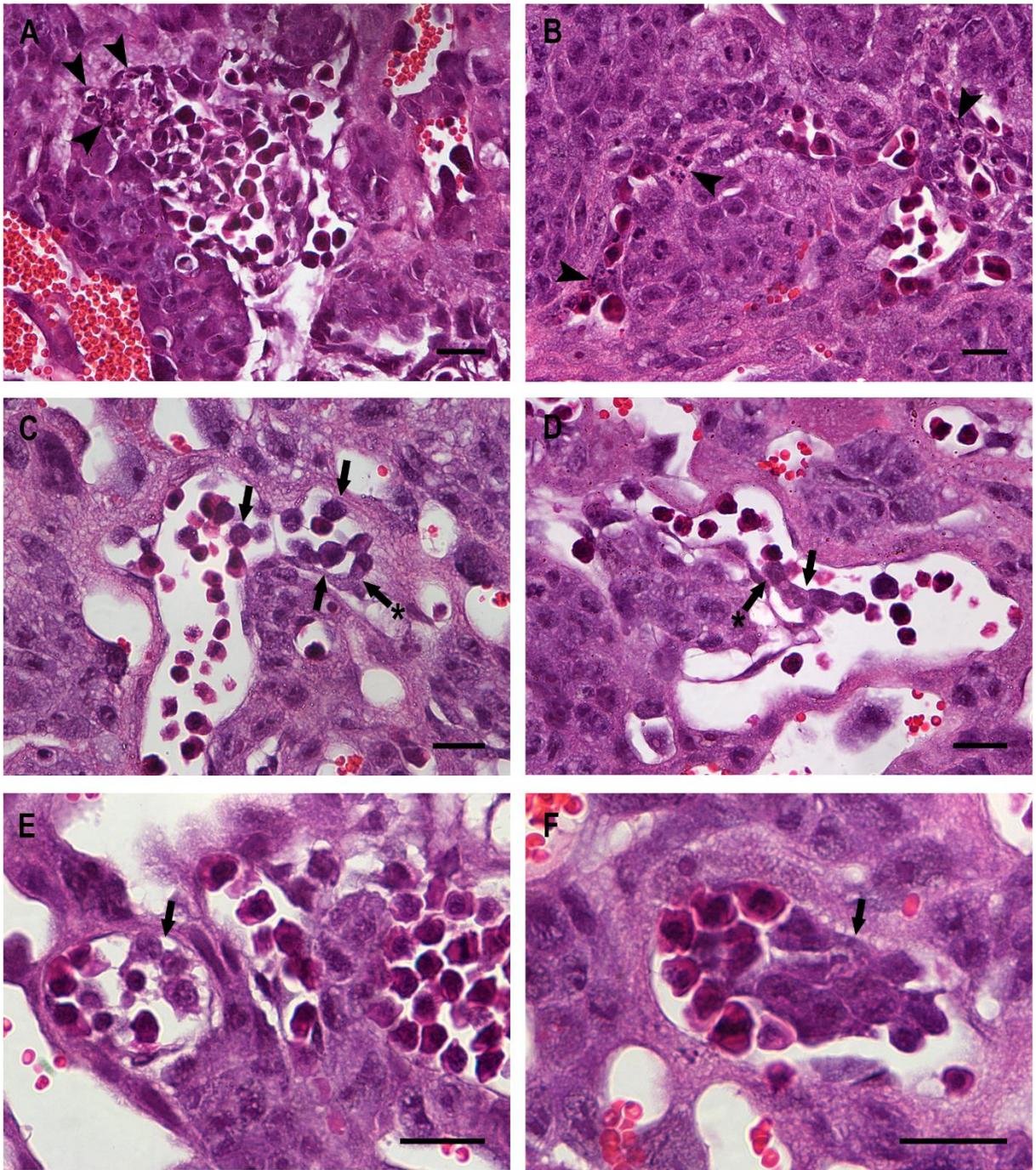


Figura 4.9.2. Região de labirinto das placentas de camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgfl^{-/-}*). (A, B) Figuras apoptóticas em vasos que chegam no labirinto. (C-F) Células hematopoéticas imaturas no interior dos vasos fetais (setas). As células imaturas são heterogêneas e parecem aderidas entre si e, às vezes, ao endotélio adjacente (C, D: *).

Figs. A-C: *Pgfl^{-/-}*, 10,5 dg; HE. Barra= 20 μ m.

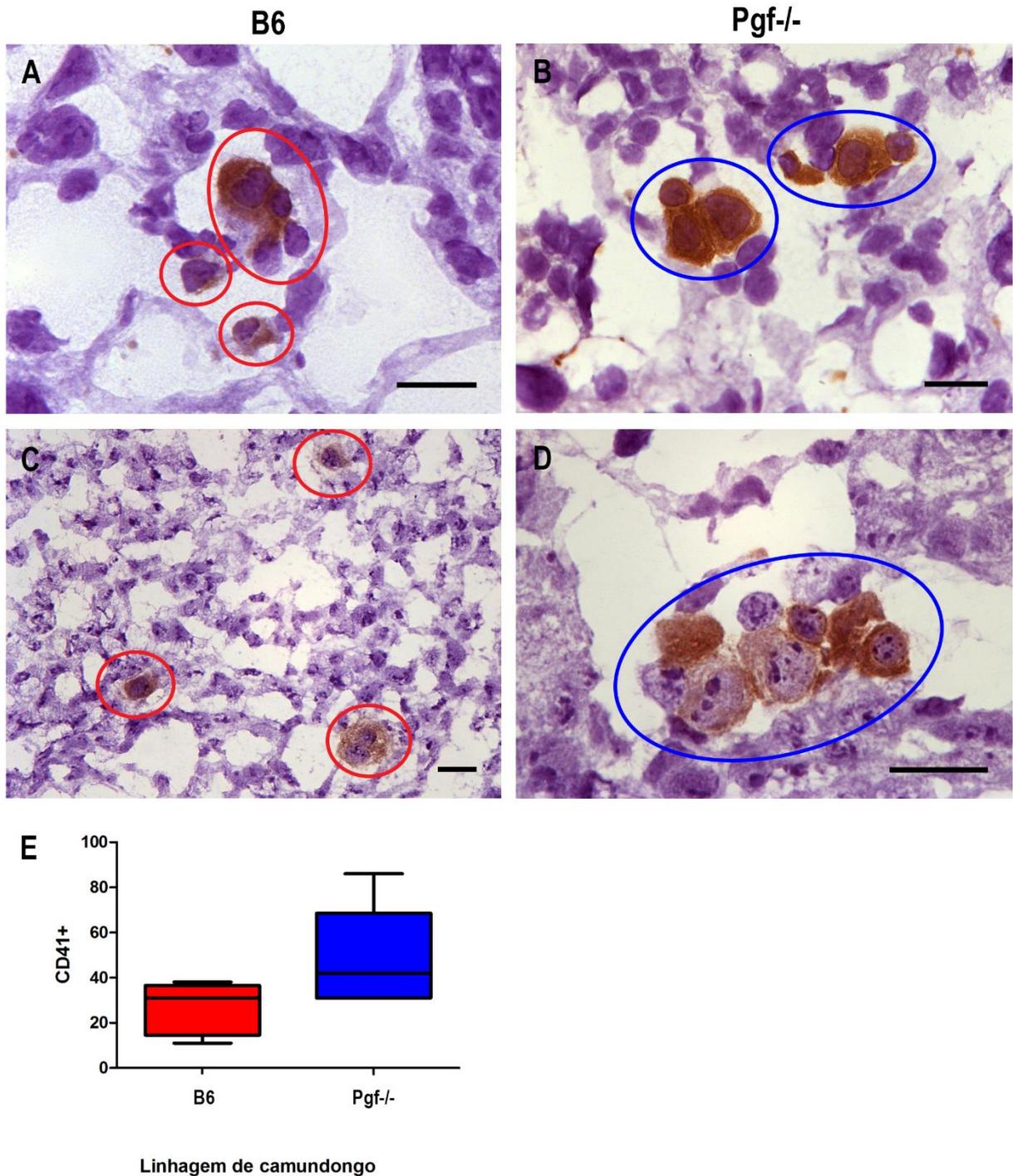


Figura 4.9.3. Comparação do número relativo de células CD41⁺ no labirinto das placentas de camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf^{-/-}*) e controle C57Bl/6 (B6). (A-D) Células hematopoéticas positivas para CD41 após imunohistoquímica. As células CD41⁺ são morfologicamente heterogêneas e possuem diferentes intensidades de expressão de CD41. As células imaturas estão frequentemente organizadas em clusters em camundongos *Pgf^{-/-}* (círculo azul). (E) Gráfico da quantidade relativas de células CD41⁺ em animais controle B6 e camundongos *Pgf^{-/-}*. Foram contadas todas as células CD41⁺ presentes em dois cortes histológicos por sítio implantacional. Os gráficos representam cinco sítios implantacionais diferentes oriundos de duas fêmeas B6 e duas fêmeas *Pgf^{-/-}* com 10,5 dg. P<0,05.

Figs. A, C: B6, 10,5 dg. **Figs. B, D:** *Pgf^{-/-}*, 10,5 dg; CD41 e hematoxilina. Barra= 20 µm.

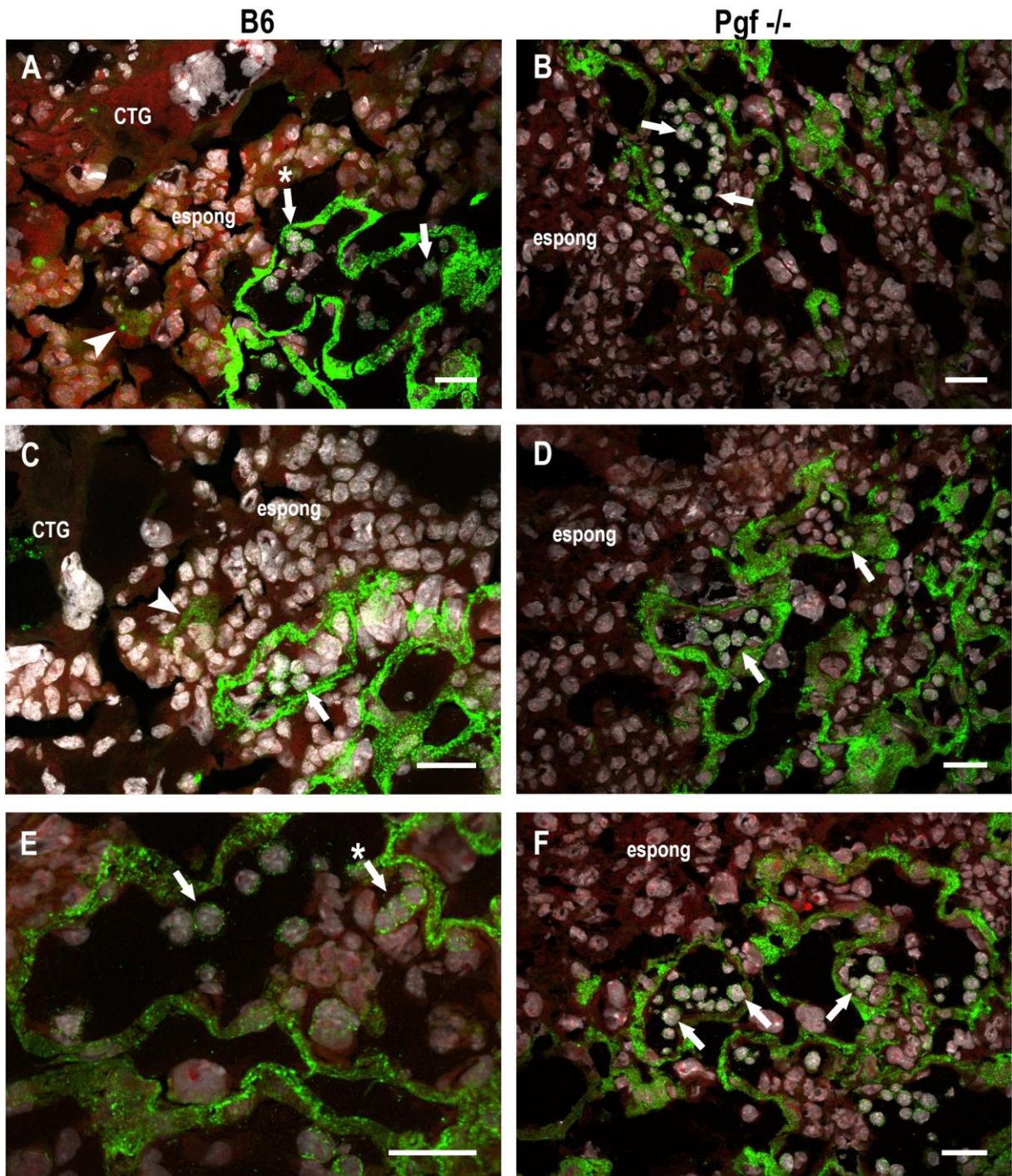


Figura 4.9.4. Expressão de CD71 na placentas de camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf^{-/-}*) e controle C57Bl/6 (B6). (A-F) Expressão de CD71 concentrada na região de labirinto da placenta de camundongos B6 (A, C, E) e *Pgf^{-/-}* (B, D, F), possivelmente no sinciotrofoblasto. Algumas células na camada espongiotrofoblástica (espong) também expressaram o CD71 no citoplasma, embora de forma menos intensa que no labirinto (A, C: cabeça de seta). Algumas células de morfologia eritroblastoide no interior dos vasos fetais também foram positivas para CD71 (A-F: setas). Células eritroblastoides unidas entre si formando *clusters* foram observadas em camundongos B6 (A, E: *)

Figs. A, C, E: B6, 10,5 dg. **Figs. B, D, F:** *Pgf^{-/-}*, 10,5 dg. **Fig. A-F:** Verde: CD71 Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 30 μ m.

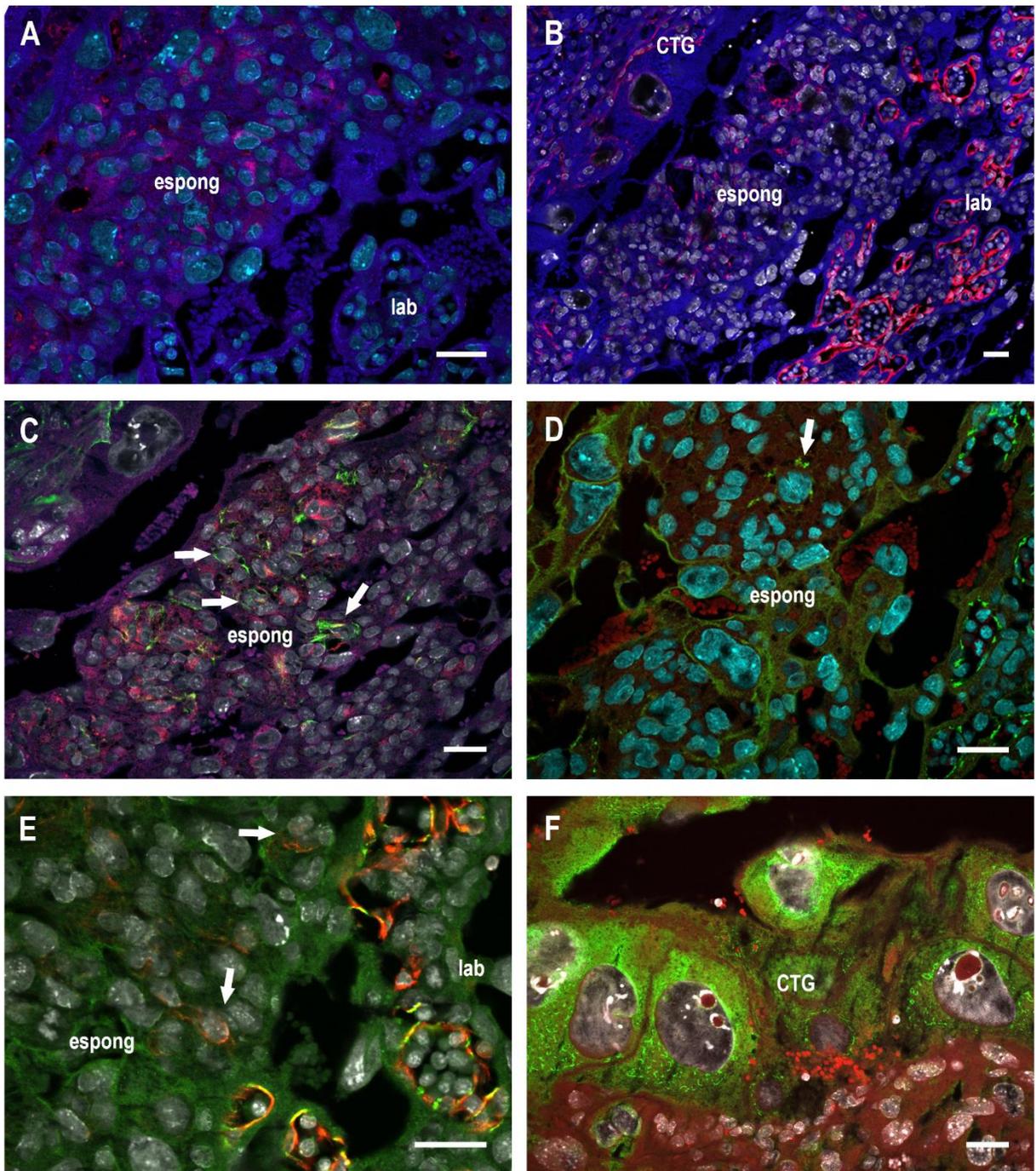


Figura 4.9.5. Imunofluorescência em camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf^{-/-}*) - I. (A) Expressão fenotípica discreta de *Tpbpa* nas células da camada espongiotrofoblástica (espong). **(B)** Algumas células espongiotrofoblásticas expressam fracamente vimentina em comparação com a forte marcação no endotélio dos vasos fetais do labirinto (lab). **(C)** Podem ser observadas raras células duplo-positivas para *Tpbpa* e vimentina (setas). **(D, E)** Expressão de *CD31* em uma célula da camada espongiotrofoblástica (seta), enquanto a maioria das células são negativas, mesmo aquelas que expressam fracamente vimentina (E: seta). **(F)** Células trofoblásticas gigantes (CTG) expressam grande quantidade de *VEGF* no citoplasma.

Fig. A: Vermelho: *Tpbpa* Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Fig. B:** Vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. C:** Verde: *CD31* Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. D:** Verde: *CD31* Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Fig. E:** Verde: *CD31* Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. F:** Verde: *VEGF* Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

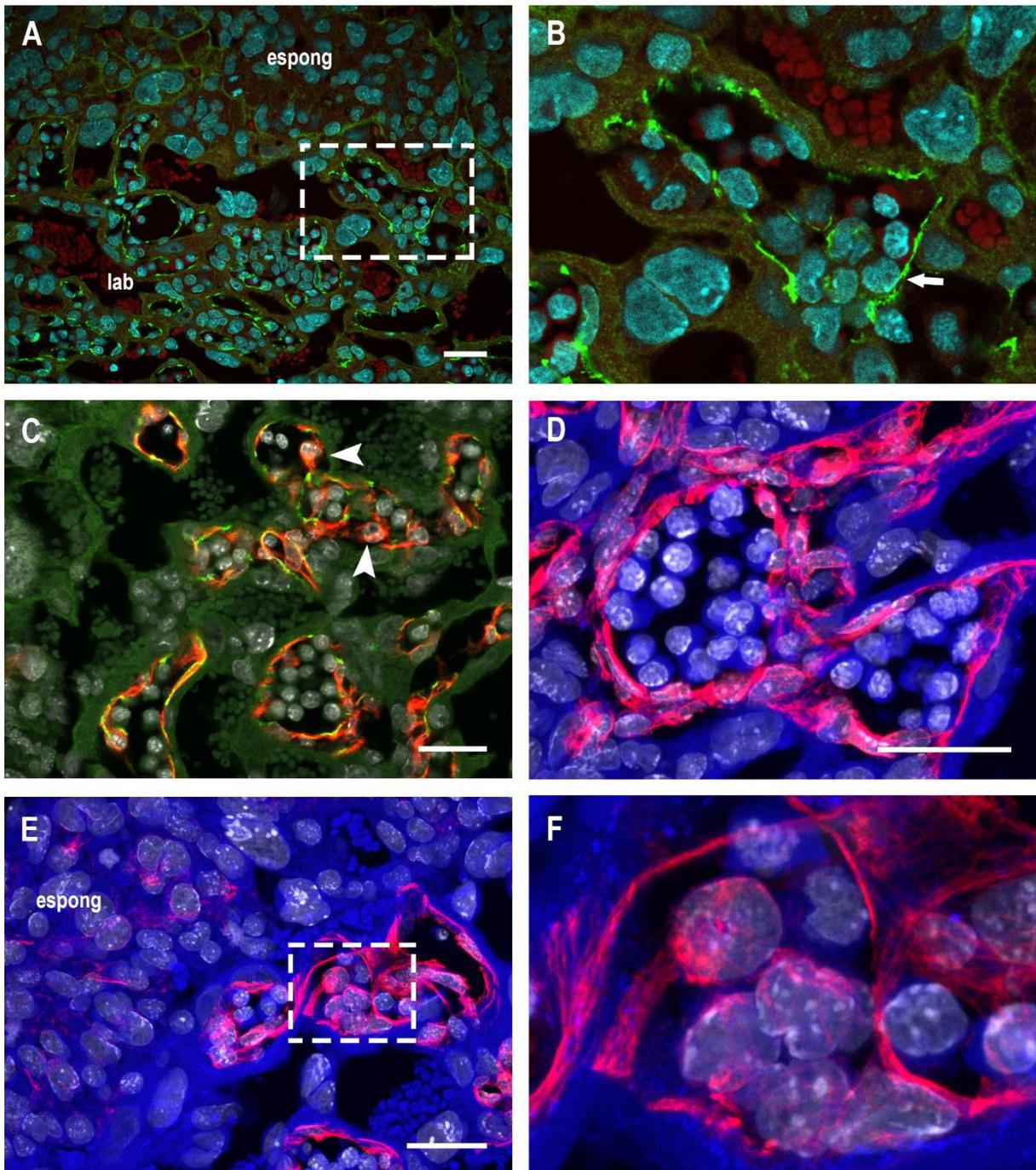


Figura 4.9.6. Imunofluorescência em camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf^{-/-}*) - II. (A, B) Expressão de CD31 nas células endoteliais dos vasos sanguíneos do labirinto (lab) e também em algumas células hematopoéticas no lúmen dos vasos (seta). **(C, D)** As células endoteliais dos vasos fetais do labirinto também expressam vimentina, e algumas delas são globosas (C: cabeça de seta) e não possuem forma elíptica como as demais células da parede do vaso. **(E, F)** Fraca positividade de vimentina pode ser observada nas células espongiotrofoblásticas. Em vasos próximos à essa região, encontram-se clusters de células vimentina positivas (F).

Figs. A, B: Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Fig. C:** Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. D-F:** Vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 μ m.

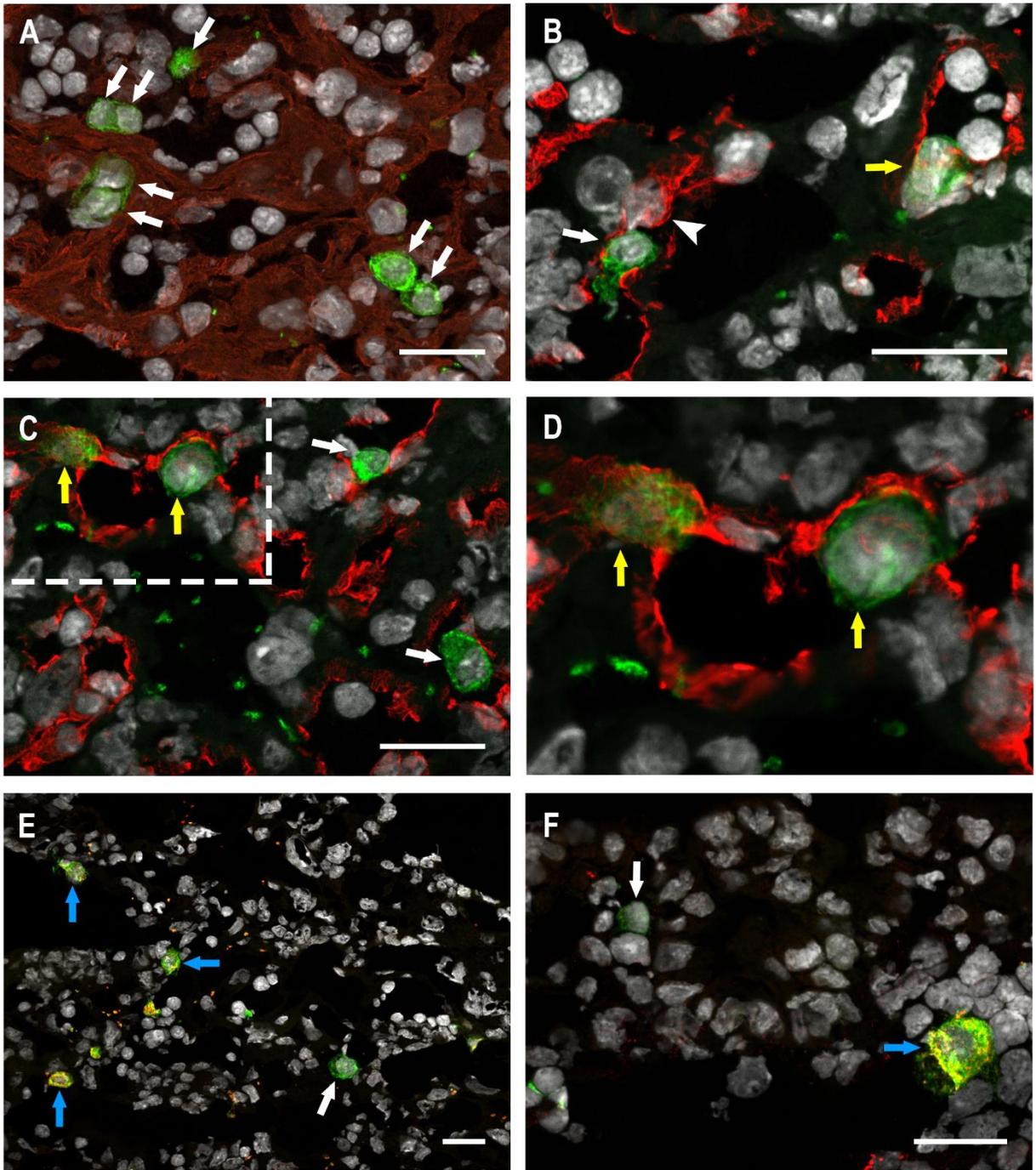


Figura 4.9.7. Imunofluorescência em camundongos *knockout* para o Fator de Crescimento Placentário (*Pgf*^{-/-}) - III. (A-F) Expressão de CD41 em células hematopoéticas no interior do vaso sanguíneo (seta branca). Algumas células CD41 positivas também expressam vimentina (seta amarela) ou vWF (seta azul). Célula endotelial globosa (B: cabeça de seta).

Fig. A: Verde: CD41 FITC, vermelho: Troma TRITC, branco: DAPI. **Figs. C-D:** Verde: CD41 FITC, vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Figs. E, F:** Verde: CD41 FITC, vermelho: vWF Alexa Fluor 546, branco: DAPI. **Fig. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 µm.

4.10 Enxerto subcapsular renal

Das 11 fêmeas grávidas Rag^{-/-}γc⁻ que receberam o enxerto, três morreram logo após a cirurgia por complicações do procedimento/ anestesia (Tabela 4.1). Elas tiveram seus rins coletados para confecção de blocos parafinados e análise da estrutura do órgão e do EPC no dia 0. As demais fêmeas se recuperaram da cirurgia e a maioria delas manteve a prenhez (Tabela 4.1). Destas, duas fêmeas apresentaram crescimento de enxerto visível macroscopicamente, os quais consistiam em nódulos hemorrágicos vermelho-escuros de tamanhos variados (Fig. 4.10.1). Algumas das demais fêmeas desenvolveram níveis moderados de fibrose no local do enxerto (grande conteúdo de matriz extracelular e neutrófilos) mas não obtiveram crescimento de células GFP⁺ do cone ectoplacentário (Tabela 4.1). Foram quatro enxertos no total, cuja localização foi confirmada histologicamente pela positividade aos marcadores GFP, citoqueratina-8 e Tpbpa.

Tabela 4.1. Resumo dos experimentos de enxerto de cone ecoplacentário (EPC) sob a cápsula renal de camundongos fêmeas grávidas Rag^{-/-}γc⁻.

#01	Doador = 8 sítios implantacionais doados para 2 receptores (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 8,5 dg	Receptor 1= 6 sítios implantacionais viáveis de 11,5 dg	
	Receptor 2= 8,5 dg	Receptor 2= 2 sítios implantacionais viáveis de 11,5 dg	
#02	Doador = 8 sítios implantacionais doados para 2 receptores (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 6,5 dg	Receptor 1= abortou	3 enxertos
	Receptor 2= 6,5 dg	Receptor 2= Morte à recuperação pós-anestésica	
#03	Doador = 8 sítios implantacionais doados para 2 receptores (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 6,5 dg	Receptor 1= 14 sítios implantacionais viáveis de 9,5 dg	Fibrose
	Receptor 2= 6,5 dg	Receptor 2= 9 sítios implantacionais viáveis de 9,5 dg	Fibrose
#04	Doador = 8 sítios implantacionais doados para 2 receptores (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 6,5 dg	Receptor 1= 8 sítios implantacionais viáveis de 9,5 dg	1 enxerto
	Receptor 2= 7,5 dg	Receptor 2= 9 sítios implantacionais viáveis de 10,5 dg	Fibrose
#05	Doador = 4 sítios implantacionais doados para 1 receptor (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 6,5 dg	Receptor 1= Morte à recuperação pós anestésica	
#06	Doador = 8 sítios implantacionais doados para 2 receptores (2 EPC/rim)		
	Procedimento:	Coleta:	
	Receptor 1= 5,5 dg	Receptor 1= Morte à recuperação pós anestésica	
	Receptor 2= 5,5 dg	Receptor 2= 8 sítios implantacionais viáveis de 8,5 dg	

Os quatro enxertos apresentaram características histológicas similares e, por isso, foram apresentados em conjunto nessa seção. Detalhes da análise histológica de dois deles encontram-se na figura 4.10.1 para exemplificação. O local dos enxertos foi representado por uma hemorragia e algumas CTG com longos prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 4.10.1). Foi observado infiltrado de neutrófilos próximo à cápsula renal e às CTG do doador (Fig. 4.10.1-C-F). Houve pouco comprometimento do tecido renal adjacente, que em sua maioria, não apresentou alterações visíveis ou infiltrados de células gigantes do doador. Como esperado, as células gigantes do enxerto expressaram citoqueratina-8, e foi possível observar que os longos prolongamentos citoplasmáticos eram contínuos entre as células (Fig. 4.10.2-A, B). Algumas células da cápsula renal também foram positivas para o anticorpo anti-citoqueratina-8 (Fig. 4.10.2-B). As células gigantes, e outras células de fenótipos variados, também expressaram a proteína Tpbpa com diferentes intensidades de marcação (Fig. 4.10.2-C D).

As células do enxerto puderam ser identificadas com precisão pelo anticorpo anti-GFP, que marcou intensamente o citoplasma e núcleo das células derivadas do cone ectoplacentário. Quando combinado com o anticorpo anti-vimentina, foram identificadas algumas células duplo-positivas bem como células do animal receptor positivas apenas para vimentina (Fig. 4.10.3). Algumas células GFP positivas também expressaram a molécula CD31 (Fig. 4.10.4). As células duplo-positivas estavam presentes principalmente nas células gigantes e suas projeções citoplasmáticas, e muitas vezes formavam canais ao redor de áreas hemorrágicas (Fig. 4.10.4-B-D). O endotélio dos vasos renais e algumas células de morfologia variada foram positivas para o CD31 (Fig. 4.10.4-A, B, D). Ainda que pouco comum, em alguns cortes foi observada a presença de células do doador infiltradas no tecido renal próximo à área hemorrágica (Fig. 4.10.5-A). O endotélio dos vasos renais foram negativos para o anticorpo anti-vWF, mas certa positividade de endotélio foi encontrada em vasos e outras células da cápsula renal (Fig. 4.10.5-B, C). vWF estava presente nos prolongamentos citoplasmáticos de algumas células gigantes, algumas vezes formando pequenos canais ao redor de áreas de sangue hemorrágico (Fig. 4.10.5-C, D, E). Ocasionalmente células vWF⁺ ou plaquetas estavam superpostas nas células gigantes GFP positivas, sempre ao redor dos espaços hemorrágicos (Fig. 4.10.5-E). Raras células globosas GFP positivas que

estavam na região hemorrágica também expressaram o marcador Runx-1 (Fig. 4.10.6).

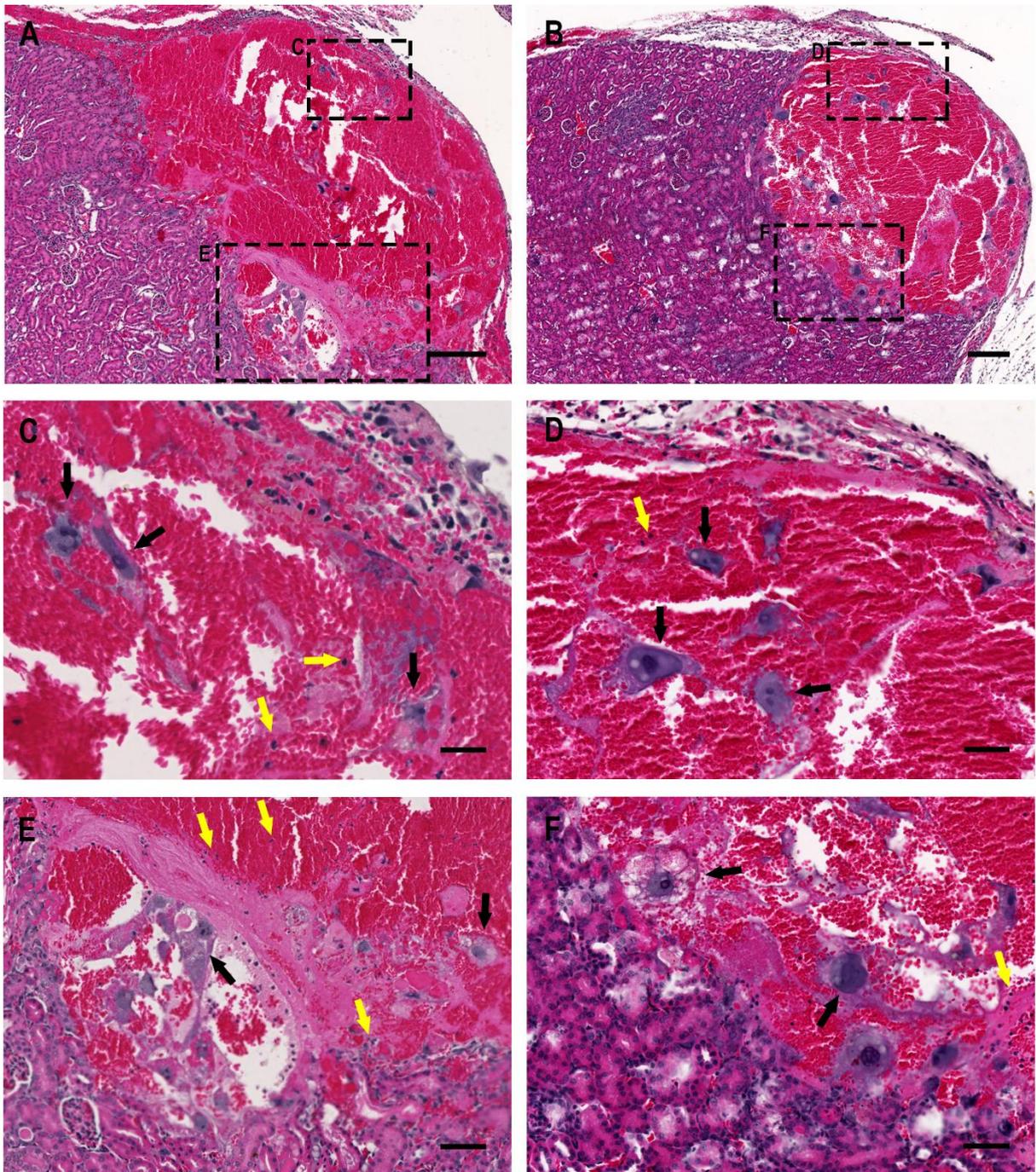


Figura 4.10.1. Aspecto histológico do enxerto subcapsular renal. (A-F) Enxerto caracterizado por hemorragia, com numerosas hemácias maternas e neutrófilos (seta amarela), e a presença de células trofoblásticas gigantes (setas).

Figs. A-F: HE. Microscópio VSlide. Barra A, B= 200 μm; C-F= 30 μm.

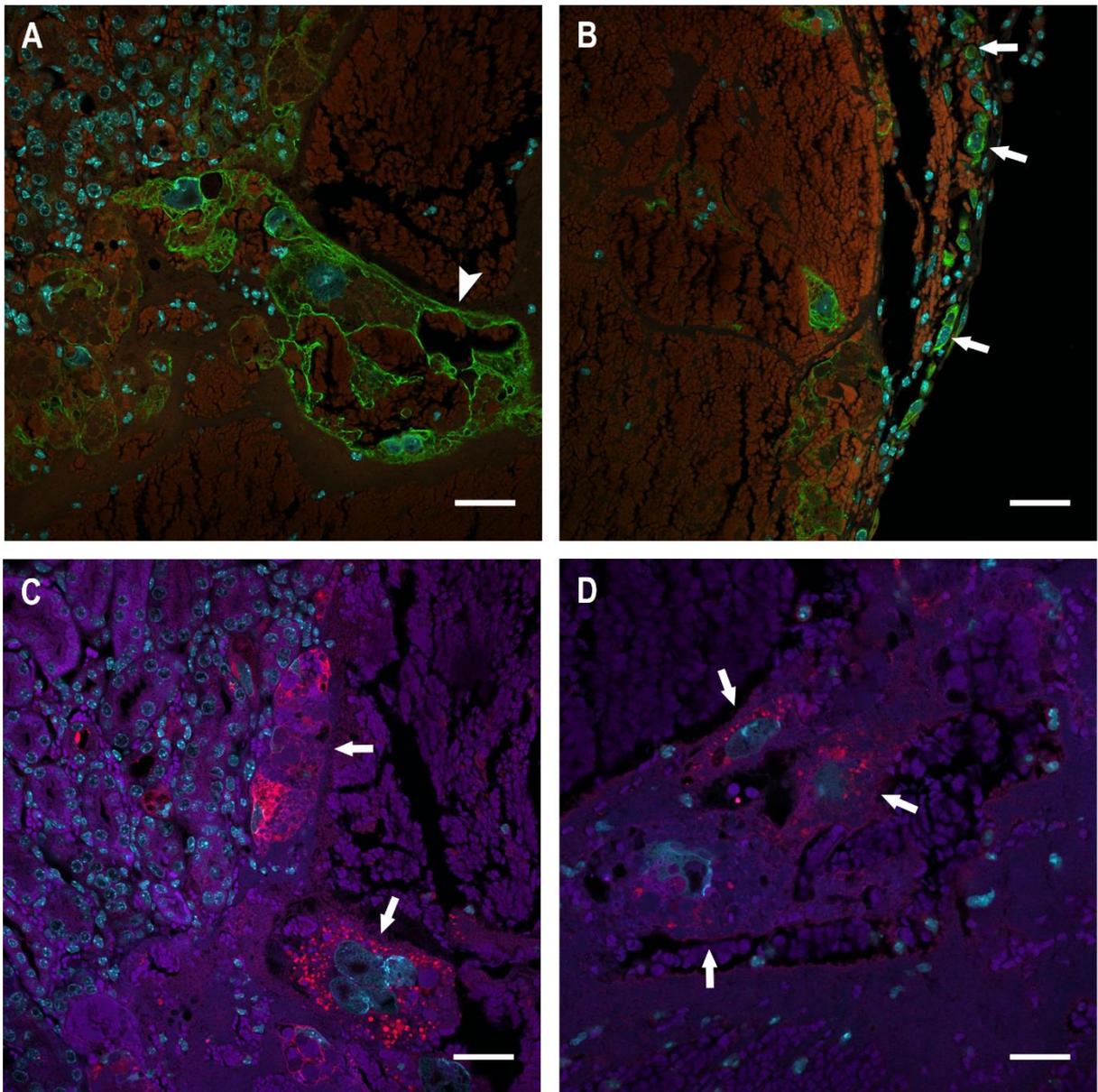


Figura 4.10.2. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: citoqueratina-8 e Tpbpa. (A, B) Expressão de citoqueratina-8 nas células trofoblásticas gigantes (CTG) do enxerto e também em algumas células menores da cápsula renal (setas). As CTG possuem longos prolongamentos citoplasmáticos das CTG. **(C, D)** Algumas CTG possuem grânulos citoplasmáticos positivos para Tpbpa. A quantidade de grânulos varia entre as células (seta).

Figs. A, B: Verde: Troma Alexa Fluor 488, ciano: DAPI. **Figs. C, D:** Vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Figs. A-D:** Confocal LSM 710. Barra= 40 µm.

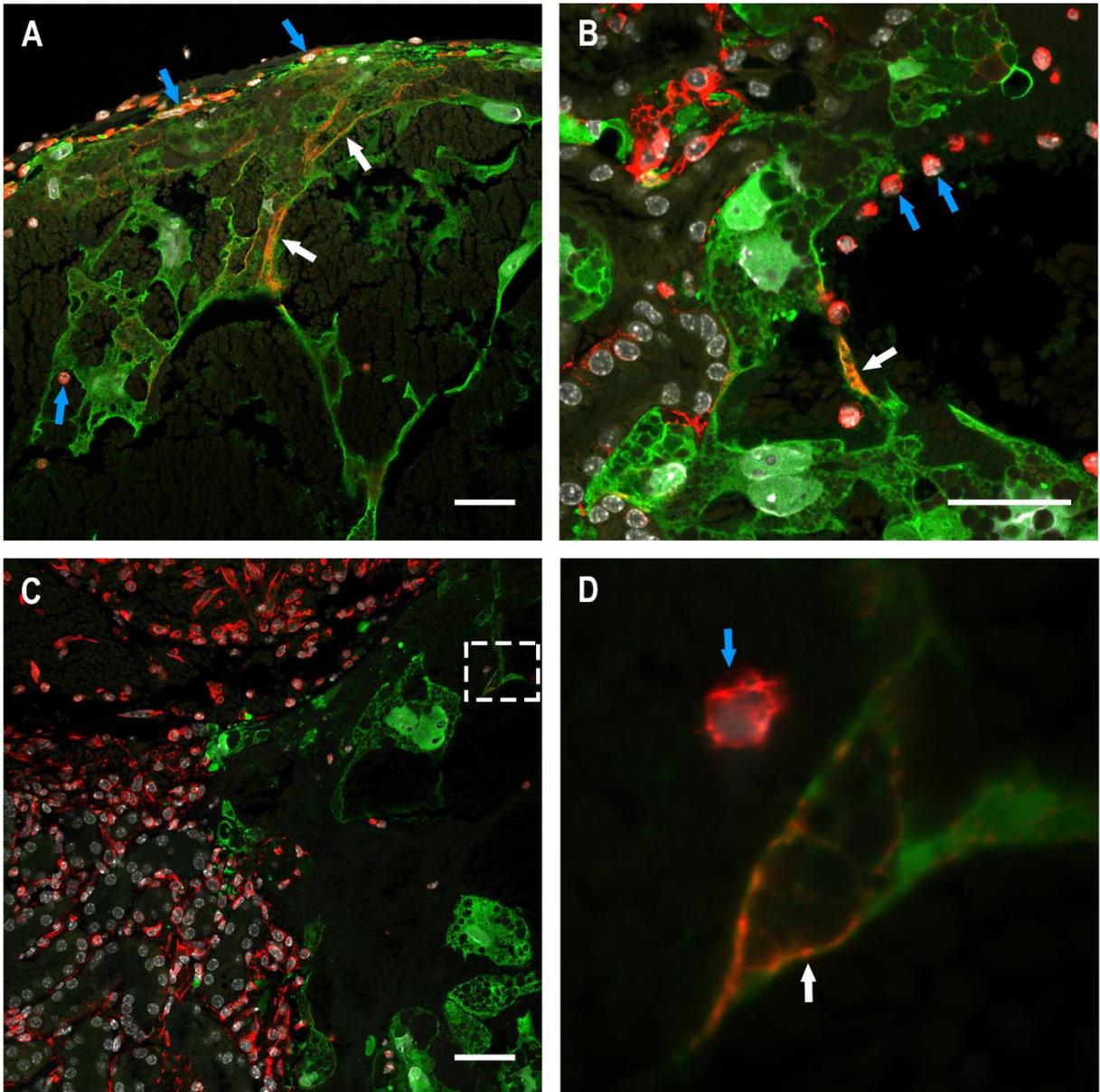


Figura 4.10.3. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: vimentina. (A, B) As células do enxerto são identificadas pela fluorescência verde do anticorpo anti-GFP. Expressão de Vimentina no citoplasma de algumas células trofoblásticas gigantes (CTG) do enxerto (seta branca). Algumas células da cápsula renal (A) ou células sanguíneas do infiltrado inflamatório (B) expressam apenas vimentina (seta azul). **(C, D)** Células endoteliais do tecido renal e células sanguíneas do animal receptor expressam fortemente vimentina (seta azul), enquanto algumas células gigantes possuem alguns filamentos citoplasmáticos (seta branca).

Figs. A-D: Verde: GFP Alexa Fluor 488, Vermelho: Vimentina Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 40 µm.

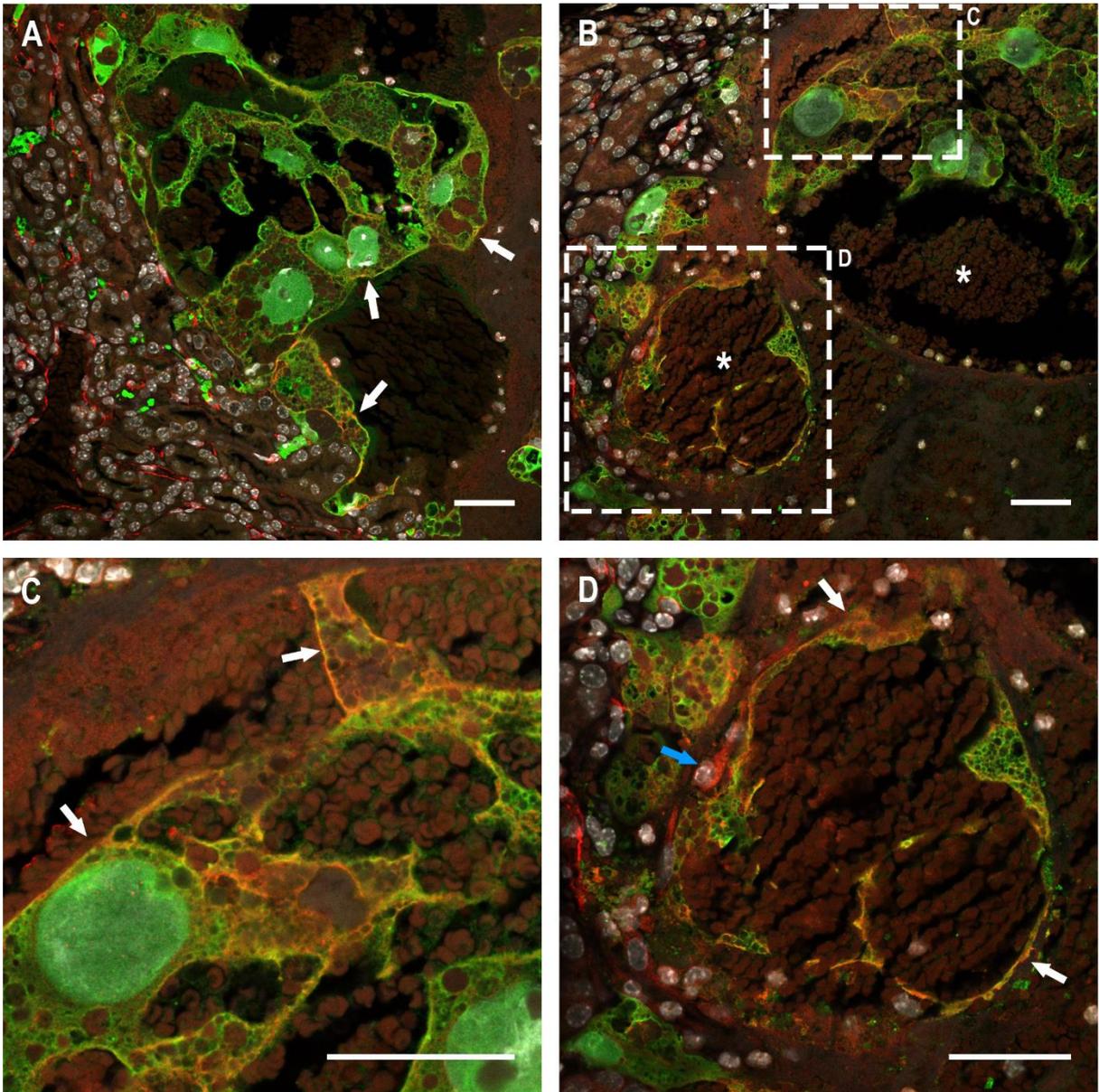


Figura 4.10.4. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: CD31. (A) Expressão de CD31 no citoplasma de algumas células trofoblásticas gigantes (CTG) do enxerto (seta branca). (B) Algumas CTG duplo-positivas e suas projeções citoplasmáticas se organizam ao redor de áreas hemorrágicas menores (B: *). (C, D) Detalhes das células duplo-positivas para GFP e CD31 que formam esses canais (seta branca). Células que expressam apenas CD31 também podem ser visualizadas.

Figs. A-D: Verde: GFP Alexa Fluor 488, Vermelho: CD31 Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra= 40 μ m.

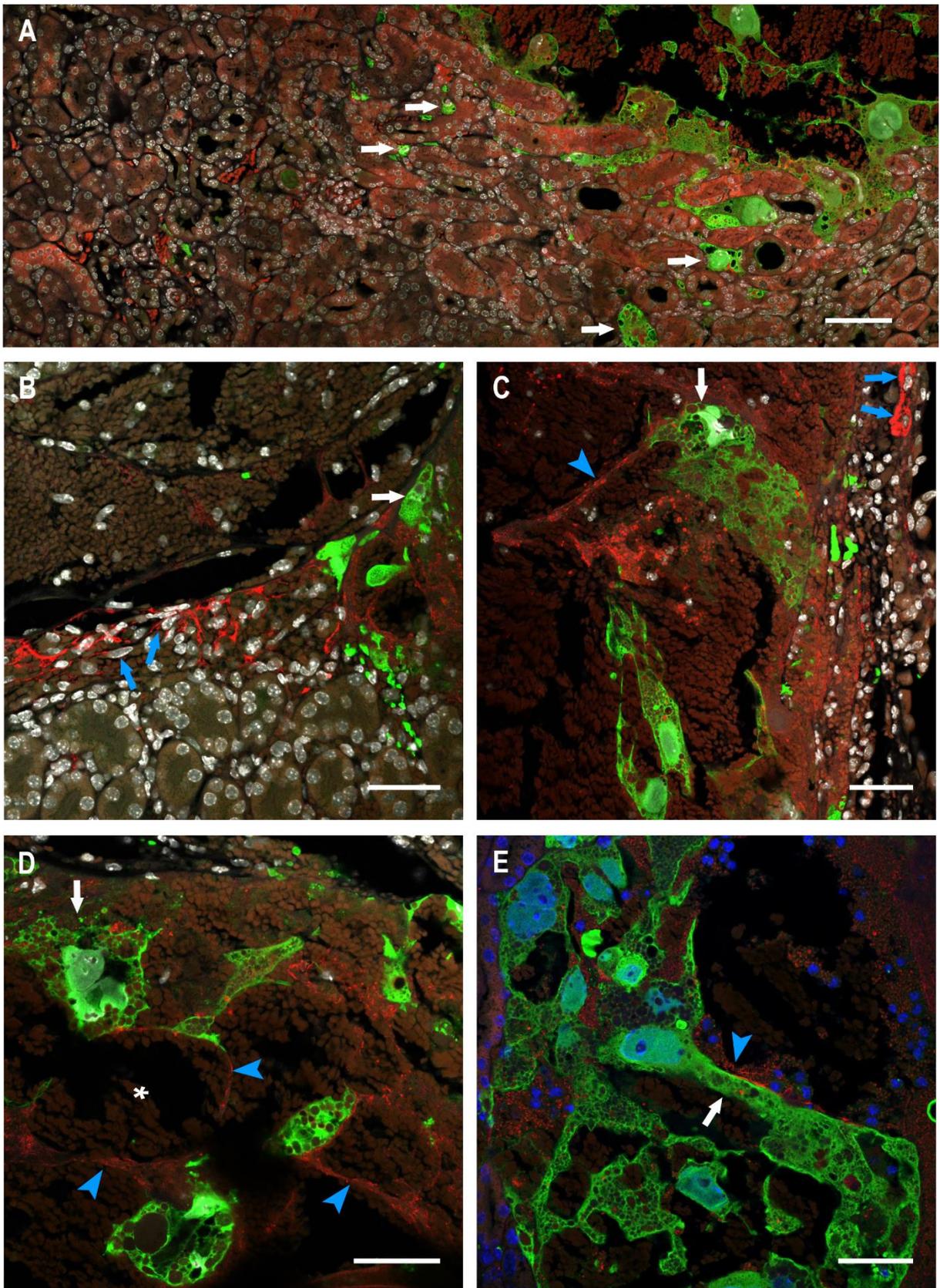


Figura 4.10.5. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: vWF. (A) Expressão de GFP entre os glomérulos renais (seta branca). (B) Algumas células da cápsula renal positivas apenas para vWF (seta azul). (C-E) vWF nos prolongamentos citoplasmáticos de algumas células gigantes formando canais ao redor de áreas hemorrágicas (cabeça de seta).

Figs. A-D: Verde: GFP Alexa Fluor 488, Vermelho: vWF Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Confocal LSM 710. Barra A= 70µm; B-E= 40 µm.

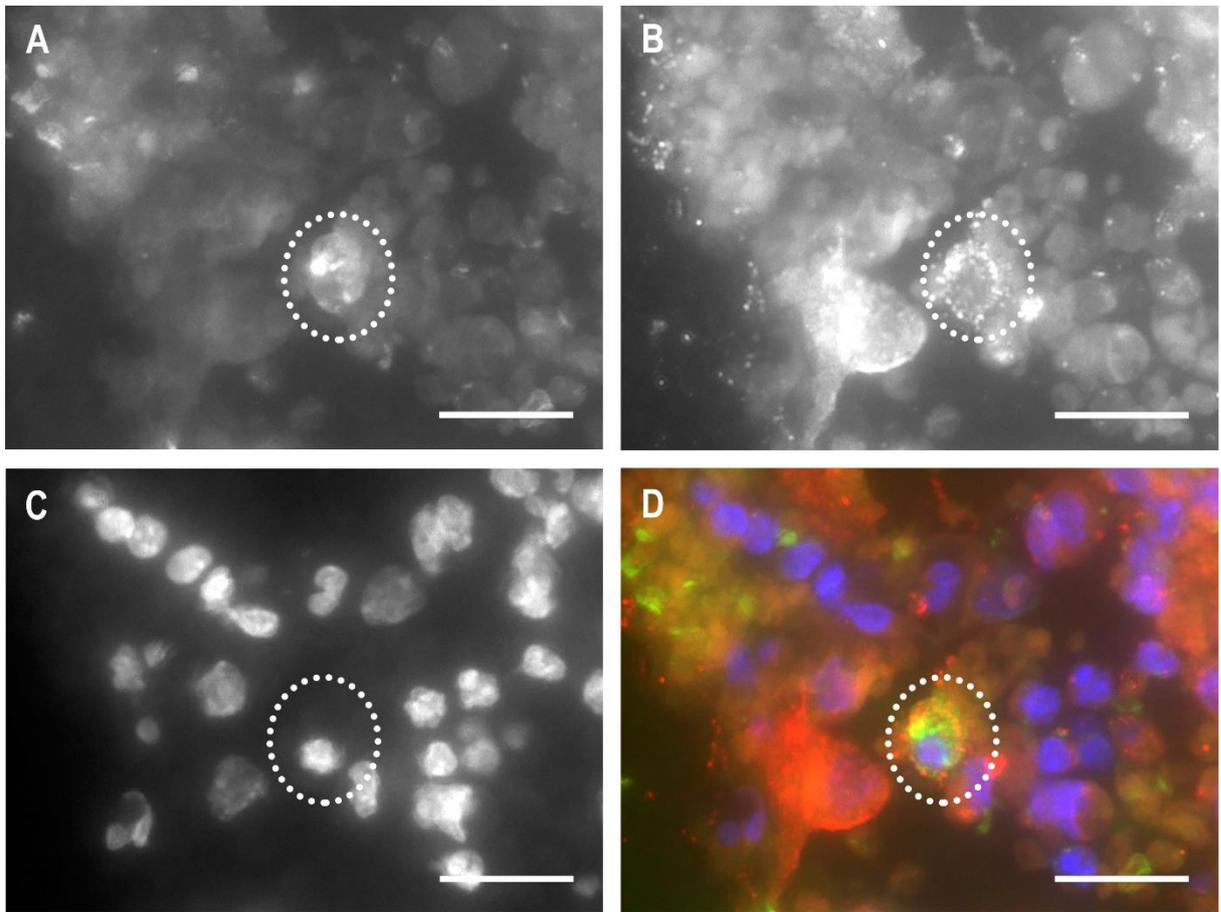


Figura 4.10.6. Imunofluorescência do enxerto subcapsular renal: Runx1. (A-D) Célula globosa do doador expressando Runx1 (A), GFP (B) e DAPI (C). A sobreposição dos canais de fluorescência encontra-se em D.

Figs. A-D: Verde: GFP Alexa Fluor 488, Vermelho: vWF Alexa Fluor 546, branco: DAPI. Microscópio de fluorescência Axiovert M1. Barra= 20 μ m.

4.11 Outros tecidos extraembrionários e fetais

Com a coleta de todo o sítio implantacional, o saco vitelínico e o feto estavam presentes em quase todos os cortes histológicos. Dependendo da altura do plano de corte do feto, sítios hematopoéticos como a aorta dorsal e o fígado fetal puderam ser observados. Assim como na placenta, as células hematopoéticas mais abundantes no interior de todos os vasos embrionários e extraembrionários em todas as idades gestacionais analisadas foram eritrócitos nucleados. Entretanto, algumas células imaturas puderam ser observadas.

O saco vitelínico consistiu em uma monocamada de células endodérmicas e uma fina camada de células mesodérmicas que envolvem o embrião (Fig. 4.11.1-A-F; 4.11.2-A-F). Aos 9,5 dg, o diâmetro dos vasos vitelínicos era heterogêneo e alguns vasos apresentavam-se mais congestionados de células do que outros (Fig. 4.11.1-A, B). No lúmen dos vasos foram encontrados numerosos eritrócitos nucleados (Fig. 4.11.1-A, B) e raras células hematopoéticas de fenótipo mais imaturo que expressavam fracamente vimentina (Fig. 4.11.1-C, D). Os vasos intraembrionários que já haviam se formado aos 9,5 dg também possuíam majoritariamente eritrócitos primitivos, mas podiam conter raras células vimentina positivas (Fig. 4.11.1-E). Encontramos em nosso material, uma região da aorta dorsal que ainda não havia se fundido, a qual continha apenas algumas células endoteliais expressando vWF (Fig. 4.11.1-F). O fígado fetal não foi analisado aos 9,5 dg.

Aos 10,5 e 11,5 dg, os vasos do saco vitelínico também apresentaram diversos tamanhos (Fig. 4.11.2-A, B). Quanto mais próximo da placenta, o saco vitelínico possuía mais vilosidades e, com isso, os vasos sanguíneos nessa região eram mais estreitos (4.11.2-C, D). Células hematopoéticas imaturas foram frequentemente observadas circulando junto com os numerosos eritrócitos primitivos (Fig. 4.11.2-C). Raramente, *clusters* de células imaturas foram observados nos vasos vitelínicos próximos da placenta (Fig. 4.11.2-D). A imunofluorescência do saco vitelínico nessas idades revelou que algumas células imaturas circulantes expressaram vimentina (Fig. 4.11.3-A), ou vWF (Fig. 4.11.3-B-D) ou VEGF (Fig. 4.11.3-E). Foi observado em um sítio implantacional, dois *clusters* de células hematopoéticas vWF positivas na região de labirinto próxima à placenta (Fig. 4.11.4-B-D). O saco vitelínico ainda apresentou expressão de Tpbpa de forma polarizada

em algumas células do endoderma, sempre na região oposta ao vaso vitelínico (Fig. 4.11.3-F).

Os vasos intraembrionários aos 10,5 e 11,5 dg eram maiores e os vasos aórticos já haviam se fundido em uma aorta dorsal única (Fig. 4.11.4-A). Foram observados alguns brotamentos de CTH a partir de projeções intraluminais do endotélio ventral da aorta dorsal (Fig. 4.11.4-B, C) e dos vasos umbilicais (Fig. 4.11.4-D). Em geral, os eritrócitos nucleados foram abundantes nos vasos sanguíneos intraembrionários (Fig. 4.11.4-E, F). Todas as células endoteliais da aorta expressaram tanto c-Kit (Fig. 4.11.5-A) quanto CD31 (Fig. 4.11.5-B). As CTH que brotavam do endotélio aórtico também expressaram CD31 (Fig. 4.11.5-B-D). Nos outros vasos intraembrionários, foram encontradas algumas células hematopoéticas imaturas que expressaram Runx1 (Fig. 4.11.5-E, F). A vimentina foi expressa por algumas células hematopoéticas na circulação fetal (Fig. 4.11.6-A, B). Curiosamente, células morfológicamente semelhantes tiveram diferentes expressões citoplasmáticas de vimentina (Fig. 4.11.6-B). Algumas células circulantes dos vasos intraembrionários também expressaram vWF (Fig. 4.11.6-C, D, E) ou VEGF (Fig. 4.11.6-F). Ainda, algumas células endoteliais dos vasos sanguíneos do feto expressaram vWF (Fig. 4.11.6-C, D).

Em alguns fetos com 10,5 ou 11,5 dg foi possível observar o fígado fetal constituído por cordões de hepatócitos imaturos intercalados por vasos sanguíneos contendo principalmente eritrócitos nucleados (Fig. 4.11.7). Algumas células hematopoéticas imaturas também foram observadas na circulação sanguínea do fígado fetal, bem como entre os cordões hepáticos (4.11.7-C, D). O endotélio dos vasos do fígado fetal foi positivo para vimentina, assim como algumas células imaturas circulantes e eventualmente células hematopoéticas fora dos vasos sanguíneos, organizadas como células individuais em contato íntimo com os hepatócitos (Fig. 4.11.8-A-C). Os vasos sanguíneos do fígado fetal foram negativos para o anticorpo contra vWF, mas alguns conjuntos de células hematopoéticas neste órgão foram positivos para vWF (Fig. 4.11.8-D-F).

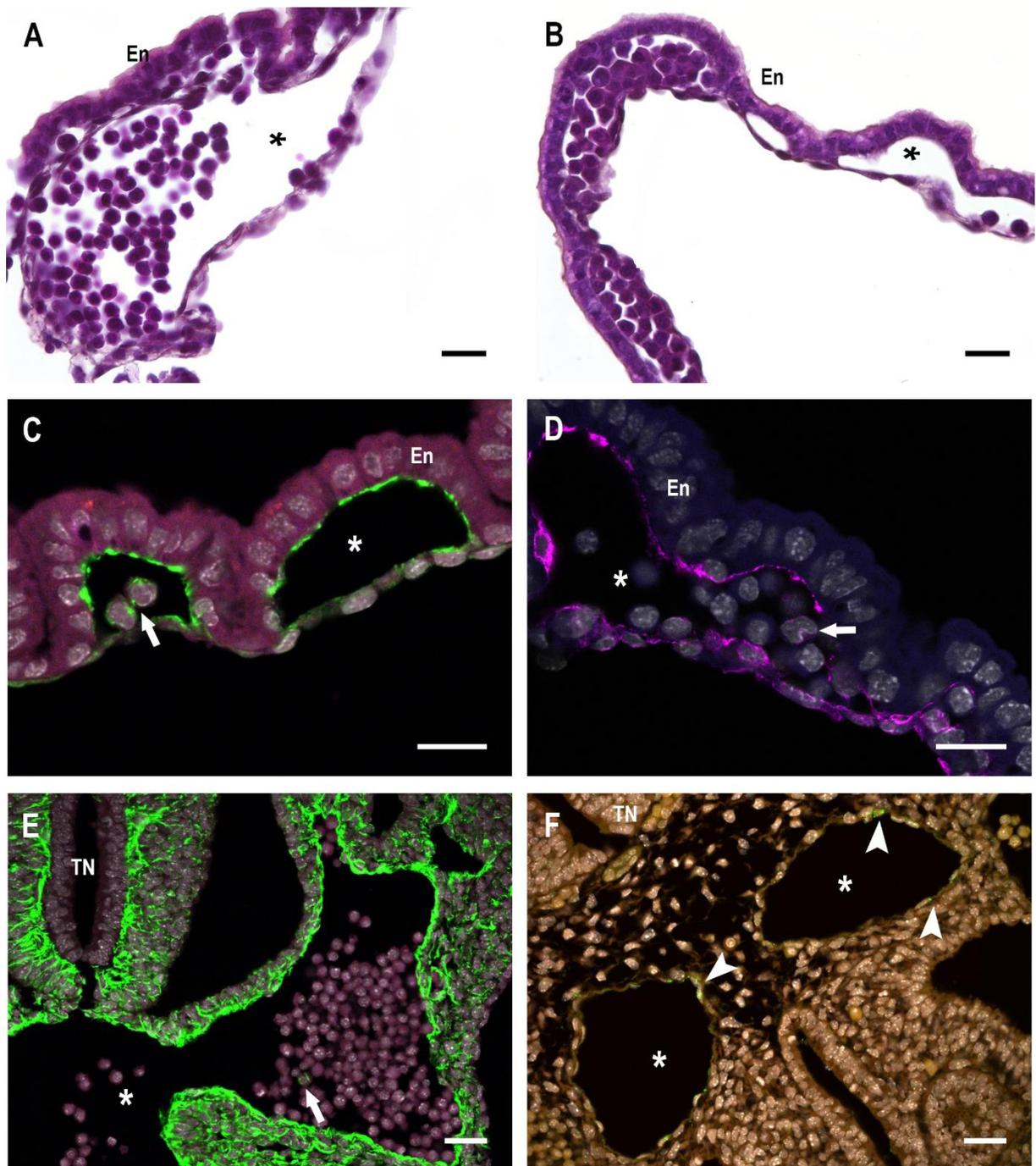


Figura 4.11.1. Saco vitelínico e aorta dorsal aos 9,5 dg (A, B). Vilosidades do saco vitelínico que consistem em uma monocamada de endoderma (En) adjacente ao vaso sanguíneo (*). Na circulação vitelínica encontram-se numerosos eritrócitos nucleados. **(C, D)** Junto com os eritrócitos são observadas raras células imaturas que expressam vimentina (seta). **(E)** Vasos intraembrionários (*) próximos ao tubo neural (TN) contém algumas células imaturas que expressam vimentina (seta). **(F)** Região da aorta dorsal que ainda não se fundiu (*) contém raras células endoteliais que expressam vWF (cabeça de seta).

Figs. A, B: HE. **Figs. C-E:** Verde/ roxo: vimentina Alexa Fluor 488, branco: DAPI. **Fig. F:** Verde: vWF Alexa Fluor 488, branco: DAPI. **Figs. C-F:** Confocal LSM 710. Barra= 20 µm.

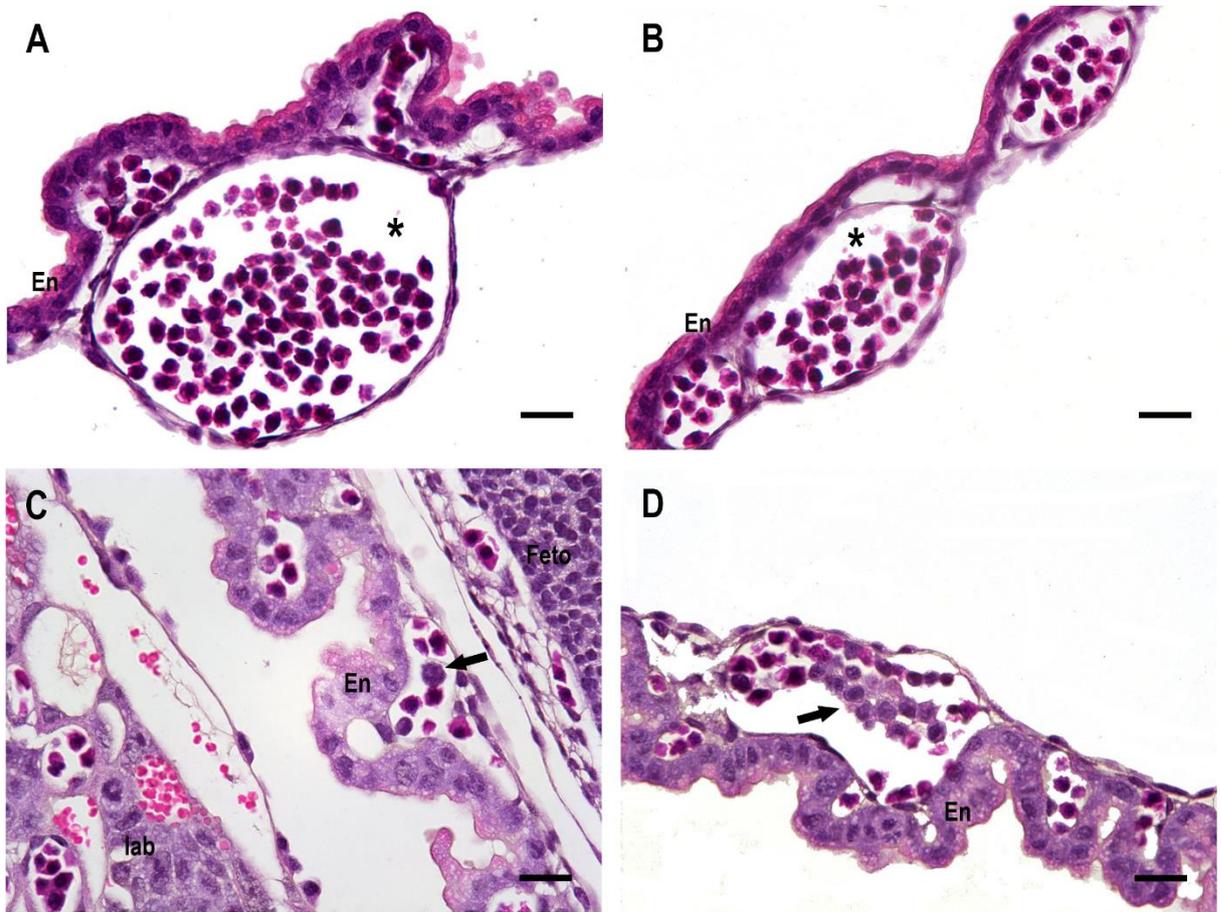


Figura 4.11.2. Saco vitelínico aos 10,5 dg. (A, B) Vilosidades do saco vitelínico que consistem em uma monocamada de endoderma (En) adjacente ao vaso sanguíneo (*). Na circulação vitelínica encontram-se numerosos eritrócitos nucleados. (C, D) O saco vitelínico apresenta mais vilosidades quando próximo à placenta. Algumas células imaturas isoladas ou em grupo de células são observadas junto aos eritrócitos (seta).

Figs. A, B: B6, 10,5 dg, HE. Barra= 20 μ m.

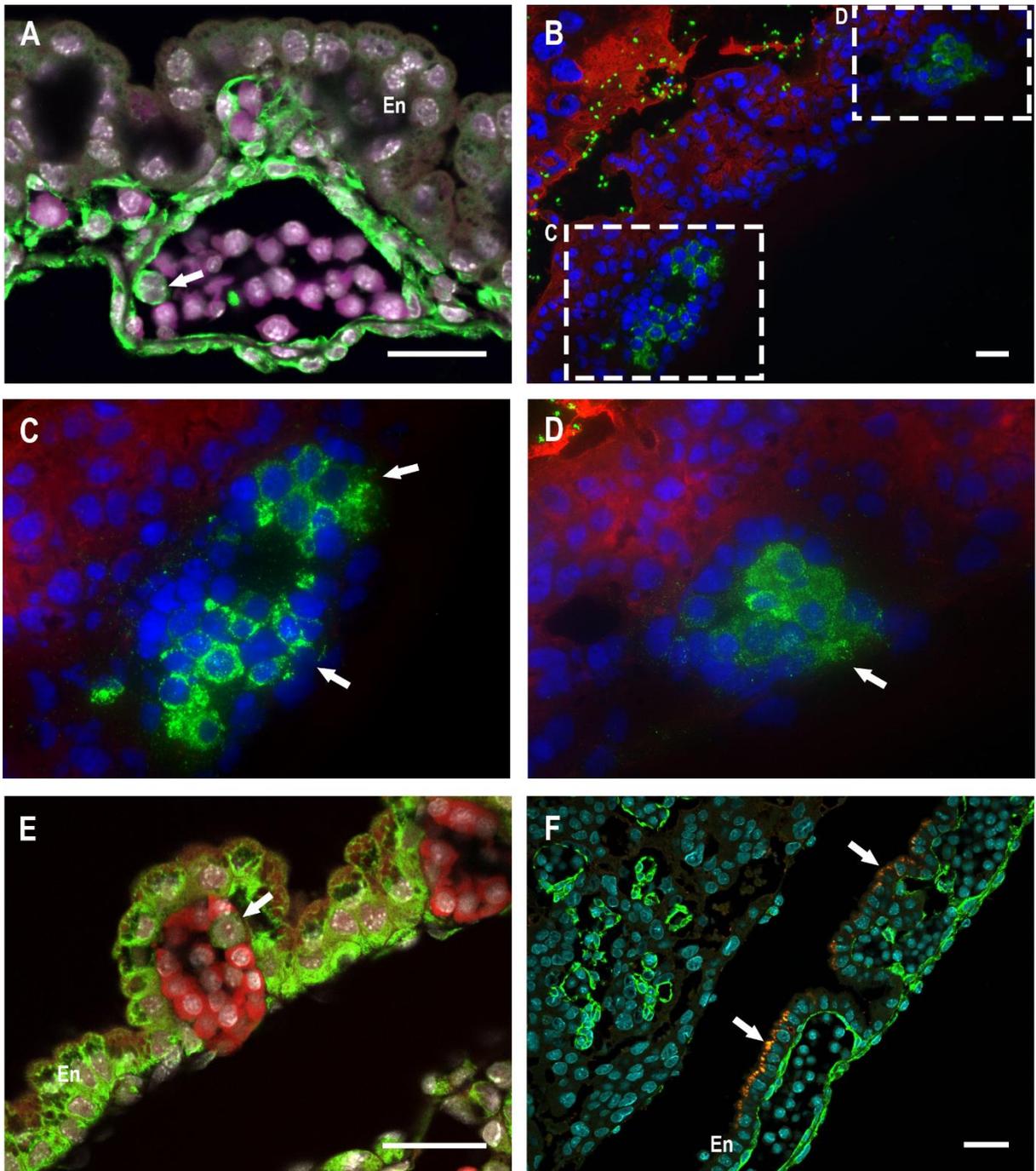


Figura 4.11.3. Fenótipo das células imaturas no saco vitelínico aos 10,5 dg. (A) Células hematopoéticas imaturas no lúmen do vaso do saco vitelínico expressam fenotipicamente Vimentina (seta). (B-D) Clusters de células hematopoéticas vWF positivas em dois vasos vitelínicos próximos à placenta (seta). (E) Algumas células na circulação sanguínea do saco vitelínico expressam VEGF (seta). (F) Algumas células endodérmicas expressaram Tpbpa de forma polarizada na célula (seta). En: endoderma.

Fig. A: B6, 10,5 dg, Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. B-D:** B6, 10,5 dg, Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: Troma Alexa Fluor 594, azul: DAPI. **Fig. E:** B6, 10,5 dg, Verde: VEGF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. F:** SW, 10,5 dg, Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: Tpbpa Alexa Fluor 546, ciano: DAPI. **Fig. A, E, F:** Confocal LSM 710; **Fig. B-D:** Microscópio de fluorescência Axiovert M1. Barra= 30 µm.

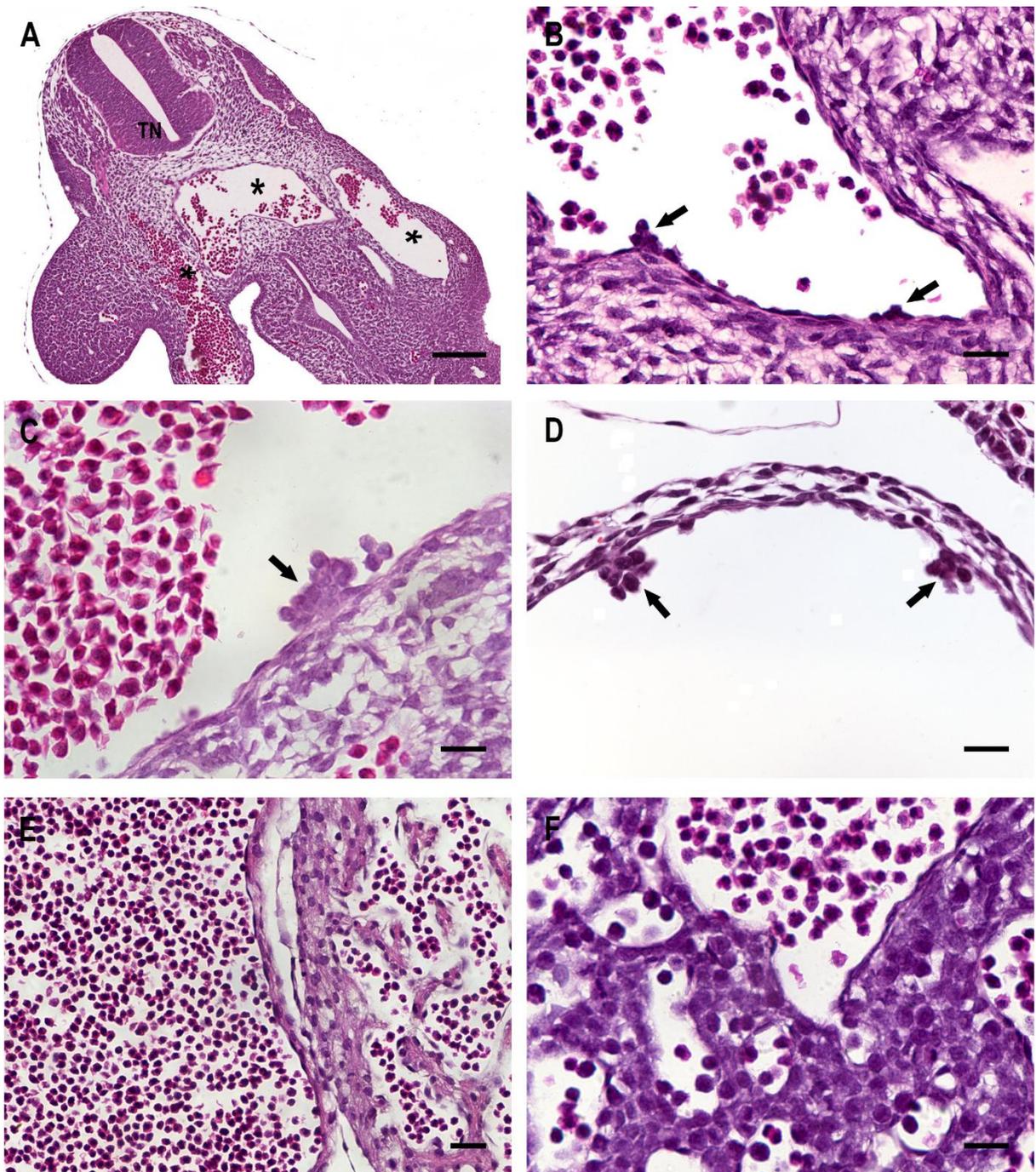


Figura 4.11.4. Vasos intraembrionários e umbilicais aos 10,5 dg. (A) Feto com 10,5 dias gestacionais com uma aorta dorsal única (*) localizada abaixo do tubo neural (Back et al). Outros vasos embrionários laterais e largos são visualizados nesse corte (*). (B-D) Brotamentos intraluminiais de células tronco hematopoéticas na porção ventral da aorta dorsal (B, C: setas) e de um segmento de um vaso umbilical (D: setas). (E-F) Outros vasos embrionários com numerosos eritrócitos nucleados.

Figs. A, B: B6, 10,5 dg, HE. Barra A= 150 μ m; B-D, F= 20 μ m; E= 30 μ m.

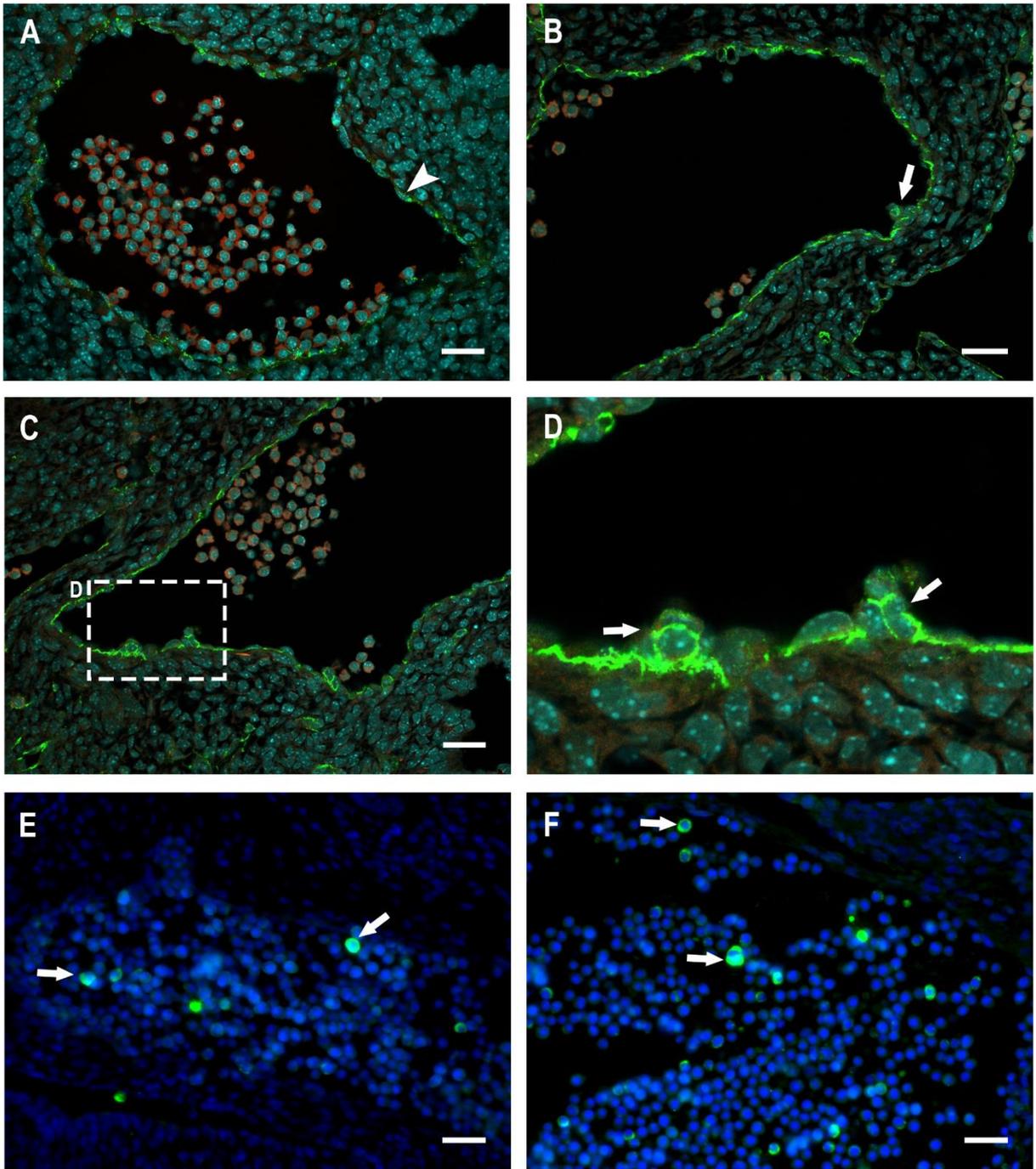


Figura 4.11.5. Fenótipo das células imaturas dos vasos intraembrionários aos 10,5 dg - I. (A) Todas as células endoteliais da aorta dorsal expressam c-Kit (cabeça de seta). (B-D) As células endoteliais da aorta dorsal também expressam CD31, assim como as células tronco hematopoéticas que brotam do endotélio hemogênico (setas). (E, F) Presença de células hematopoéticas imaturas Runx1 positivas em vasos intraembrionários largos (setas).

Fig. A: B6, 10,5 dg, Verde: c-Kit Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Fig. B-D:** B6, 10,5 dg, Verde: CD31 Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, ciano: DAPI. **Figs. E, F:** B6, 10,5 dg, Verde: Runx1 Alexa Fluor 488, azul: DAPI. **Fig. A-D:** Confocal LSM 710; **Fig. E, F:** Microscópio de fluorescência Axiovert M1. Barra= 30 µm.

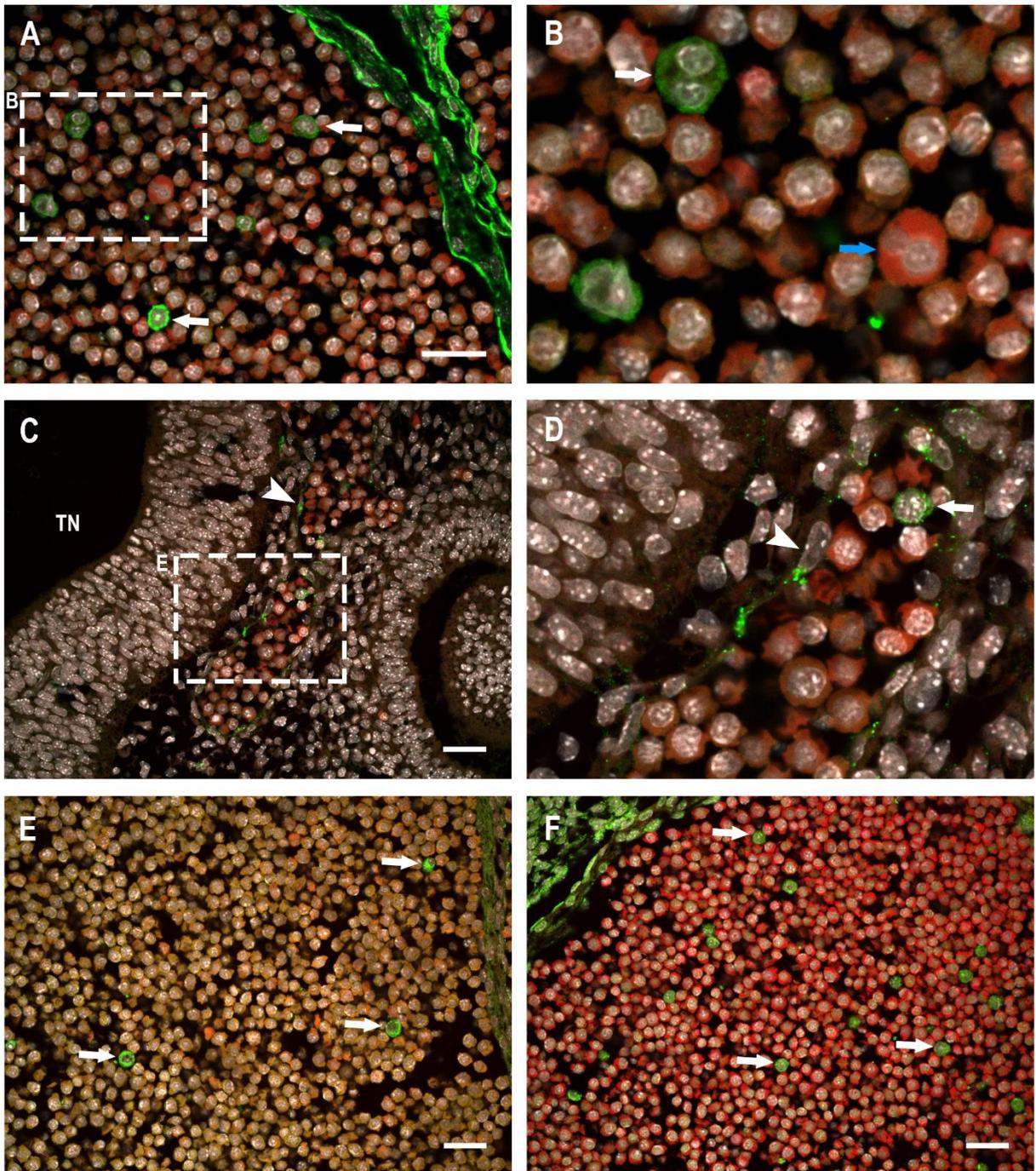


Figura 4.11.6. Fenótipo das células imaturas dos vasos intraembrionários aos 10,5 dg - II. (A, B) Expressão de vimentina em algumas células imaturas hematopoéticas no interior de um vaso intraembrionário (seta). Apesar de morfologicamente semelhantes, algumas células imaturas com dois núcleos/ núcleo bilobado diferem quanto à presença (seta branca) ou ausência (seta azul) de vimentina. (C-E) Algumas células endoteliais de um vaso lateral ao tubo neural (TN) expressam vWF, assim como uma célula imatura no interior deste vaso e de outros vasos intraembrionários (setas). (F) Algumas células na circulação sanguínea fetal expressam VEGF (setas).

Figs. A, B: B6, 10,5 dg, Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. C, D:** SW, 10,5 dg, Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. E:** Verde: vWF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. F:** B6, 10,5 dg, Verde: VEGF Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Fig. A-F:** Confocal LSM 710. Barra= 30 μ m.

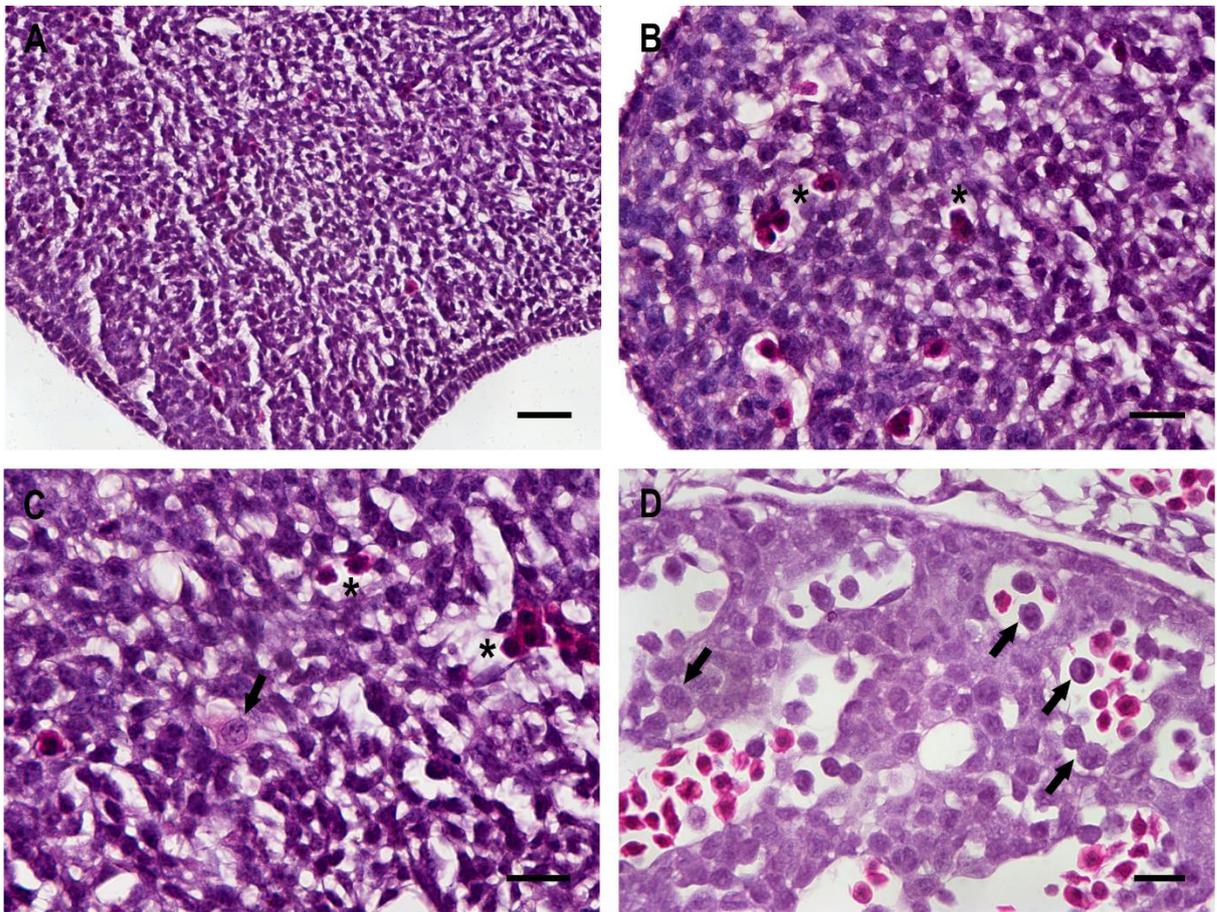


Figura 4.11.7. Fígado fetal aos 10,5 dg. (A-D) Fígado fetal formado por cordões de hepatócitos intercalados por vasos sanguíneos contendo eritrócitos (*). Algumas células hematopoéticas imaturas são identificadas pela sua morfologia e coloração entre os cordões de hepatócitos e vasos sanguíneos (seta).

Figs. A, B: B6, 10,5 dg, HE. Barra A= 40µm, B-D= 20 µm.

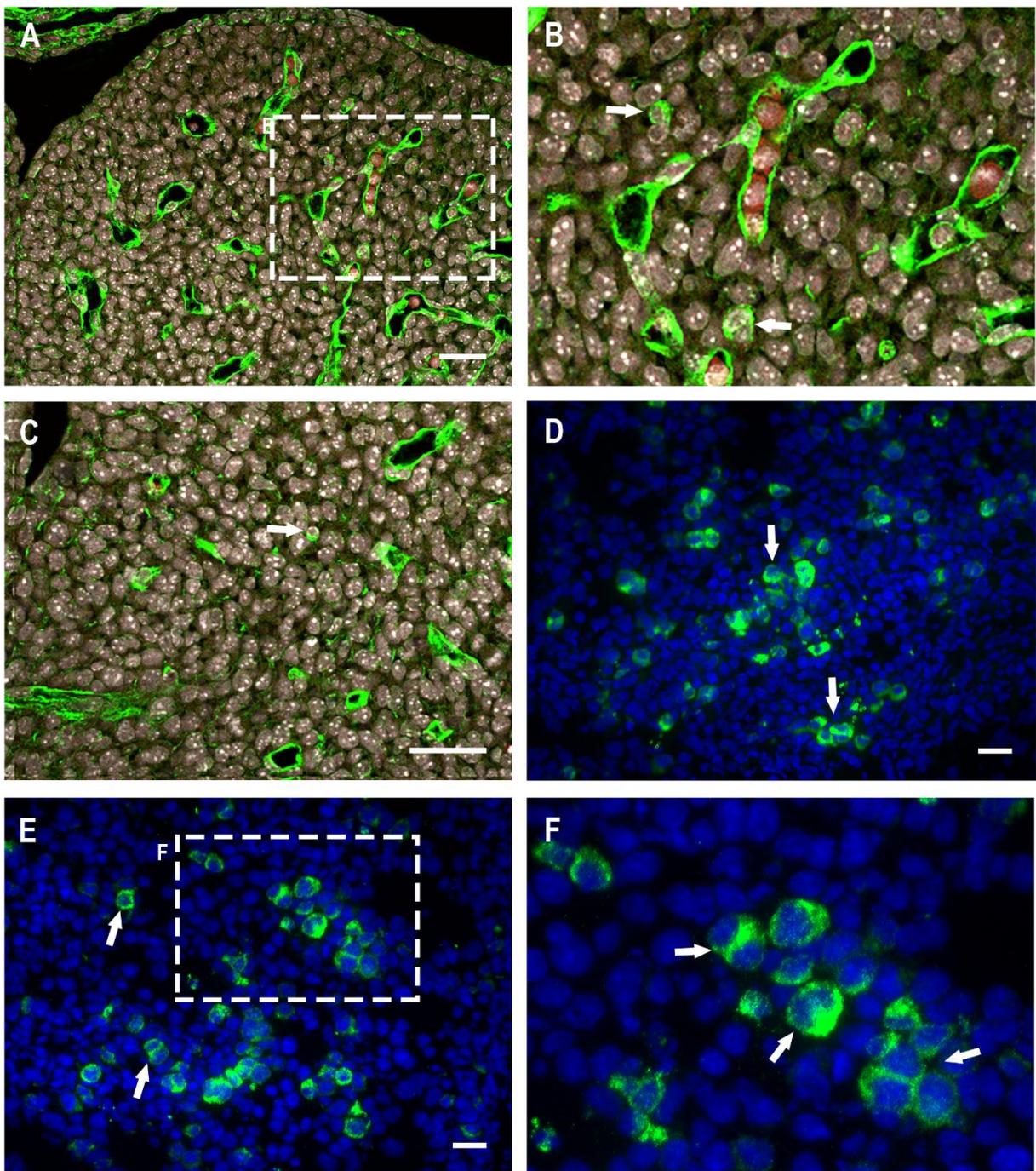


Figura 4.11.8. Fenótipo das células imaturas no fígado fetal na metade da gestação. (A-C) O anticorpo anti-vimentina marcou o endotélio dos vasos sanguíneos do fígado fetal bem como algumas células isoladas entre os cordões hepáticos (setas). **(D-F)** Aglomerados de células hematopoéticas imaturas que expressam vWF (setas).

Figs. A-C: B6, 10,5 dg, Verde: Vimentina Alexa Fluor 488, vermelho: azul de Evans, branco: DAPI. **Figs. D-F:** B6, 10,5 dg, Verde: vWF Alexa Fluor 488, azul: DAPI. **Fig. A-C:** Confocal LSM 710; **Fig. D-F:** Microscópio de fluorescência Axiovert M1. Barra= 30 μm.

4.12 Expressão gênica de células CD41⁺ após captura por microdissecção a laser (LCM)

Áreas contendo as células CD41⁺ da região do labirinto da placenta foram delimitadas com ajuda do PALM RoboSoftware e então capturadas por laser de alta energia em um tubo coletor para a análise da expressão gênica dessa população celular. Foram utilizadas placentas de cinco fêmeas B6 de acasalamentos singênicos (n=1) ou com machos Balbc-GFP (n=4). Neste trabalho, lidamos com dois fatores limitantes à amplificação gênica: a baixa quantidade de células hematopoéticas imaturas por sítio implantacional, a qualidade do RNAm após o processamento histológico e o longo tempo de manipulação. Problemas durante o processamento histológico foram minimizados com o uso de reagentes preparados a fresco e diluídos em água ou PBS estéreis e livres de nucleases, e com a adição de inibidor de RNase. Ainda assim, o tempo de captura das células no microscópio não deveria passar de 50 minutos. Somando-se a isso, a baixa quantidade de células imaturas por corte histológico, tivemos que fazer não só um *pool* de células de vários cortes da mesma placenta, mas também misturar células capturadas de diferentes sítios implantacionais da mesma fêmea (tabela 4.2).

Primeiro, foram microdissecadas todas as células CD41⁺ da região de labirinto, independente da sua morfologia (Fig. 4.12.1-A-C). O número de células capturadas variou entre os sítios implantacionais (Fig. 4.12.1-D). Em seguida, para dois sítios coletamos duas subpopulações de células CD41⁺ baseadas na sua morfologia. Células grandes que geralmente se organizavam em *clusters* foram coletadas e denominadas de “*cluster*”. Células menores que não formavam *clusters* foram coletadas separadamente e denominadas “*single cell*” (Fig. 4.12.2-A, B). No final do experimento foram geradas duas amostras por placenta contendo subpopulações diferentes de células CD41⁺. A captura das células foi confirmada pela presença dos fragmentos na tampa do tubo coletor após cada procedimento (Fig. 4.12.2-C). A distribuição espacial no labirinto das células das duas subpopulações pode ser verificada na figura 4.12.2-D.

Foi extraído o RNA total de todos os tubos coletados. No final do processo de extração foram obtidos dois tubos com RNAm para cada tubo coletor do LCM. Cada *pool* de células gerou no final da extração duas amostras de RNAm que chamamos de LCM #1 até LCM #9. Informações de cada amostra quanto ao número de sítios

implantacionais utilizados, tubos gerados após a microdissecção para o *pool* de células e área total de células microdissecadas encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Informações da microdissecção a laser das células CD41 positivas.

LCM	Animais/ sítios implantacionais (s.i.)	Células CD41 ⁺ capturadas	Nº de tubos coletados/ pool de célula	Área total das células CD41 ⁺ capturadas
#1	Fêmea A (B6xGFP) s.i. a	Total	1	*
#2	Fêmea A (B6xGFP) s.i. b	Total	1	*
#3	Fêmea A (B6xGFP) s.i. c	Total	2	*
#4	Fêmea A (B6xGFP) s.i. c	Total	4	168.578 µm
#5	Fêmea B (B6xB6) s.i. a, b, c	Total	10	265.710 µm
#6	Fêmea C (B6xGFP) s.i. a	Total	4	266.087 µm
#7	Fêmea D (B6xGFP) s.i. a	Total	6	174.715 µm
#8	Fêmea D (B6xGFP) s.i. b	<i>single cell</i>	8	147.124 µm
		<i>Cluster</i>	8	181.673 µm
#9	Fêmea E (B6xGFP) s.i. a	<i>single cell</i>	6	153.916 µm
		<i>Cluster</i>	6	104.297 µm

* Informação não disponível.

Mesmo tomando todas as precauções para manter a integridade do RNA e fazendo o pool de células, a quantidade de RNA extraído foi pequena e nem sempre a qualidade estava adequada. Foram utilizados apenas os tubos de amostras com alto grau de pureza, indicada pelas razões A260/280 e A260/230 do espectrofotômetro. Sendo assim, foi obtido cDNA de um total de 11 amostras. Primeiro, tentamos otimizar o protocolo de qPCR convencional para as amostras microdissecadas. Entretanto, o rendimento do RNA extraído de um pequeno número de células capturadas pelo LCM é baixo. Ainda, a amplificação dos genes no qPCR convencional foi tardia, inclusive nos genes de referência. Somando-se ao alto Ct, a amplificação entre as duplicatas estava bastante heterogênea. Sendo assim, realizamos uma etapa de pré-amplificação do cDNA antes da qPCR. Foram pré-amplificadas as amostras #3 e #5, contendo células CD41 totais da placenta, e as subpopulações #8 *cluster* e #9 *single cell*.

A amostra #3 compreendeu um *pool* de células CD41⁺ obtidas de apenas um sítio implantacional de uma fêmea B6 que acasalou com macho Balbc-GFP. A amostra #5 compreendeu um *pool* de células CD41⁺ obtidas de três sítios implantacionais de uma fêmea B6 de acasalamento singênico. A amostra #8 compreendeu um *pool* de células CD41⁺ da subpopulação *cluster* obtidas de apenas um sítio implantacional de uma fêmea B6 que acasalou com macho Balbc-GFP. Por fim, a amostra #9 compreendeu um *pool* de células CD41⁺ da subpopulação *single cell* obtidas de dois sítios implantacionais de uma fêmea B6 que acasalou com macho Balbc-GFP. É importante ressaltar que o LCM #8 e #9 tiveram apenas uma das subpopulações de CD41 aproveitadas. Sendo assim, as análises das populações *cluster* e *single cell* foram feitas em sítios implantacionais de fêmeas diferentes.

Os genes alvo foram escolhidos com base na literatura descrita para células hematopoéticas em diferentes estágios de maturação bem como endotélio hemogênico. Além disso, selecionamos alguns genes presentes nos tecidos precursores da placenta. Estes compreenderam genes descritos em células mesodérmicas do córion e da alantoide, células tronco trofoblásticas, bem como aqueles presentes em populações de progenitores e células diferenciadas de trofoblasto e espongiotrofoblasto, presentes na placenta durante o início/metade da gestação. As amostras de placenta inteira de camundongos SW, sem microdissecção, foram representadas em um *heatmap* único organizado de acordo com o gene mais expresso para o menos expresso (Fig. 4.12.3-A). Todos os genes analisados nas amostras de células CD41⁺ microdissecadas totais (3 e 5) e as subpopulações (8C e 9SC) estão representados na Fig. 4.12.3-B para comparação. Os 40 genes selecionados foram ainda organizados em três grupos para traçar perfis gênicos relacionado à hematopoese (Fig. 4.12.4-A), eritropoese (Fig. 4.12.4-B) e origem (Fig. 4.12.4-C). Cada grupo foi representado por *heatmaps* em que os genes não detectados foram representados em cinza (valores zero) e os genes detectados foram distribuídos em uma escala de cores referente às suas expressões relativas ao gene de referência de cada amostra. O gene normalizador escolhido para a análise foi o *Pgk1* (Veazey & Golding, 2011), uma vez que ele se comportou de forma estável em todas as amostras.

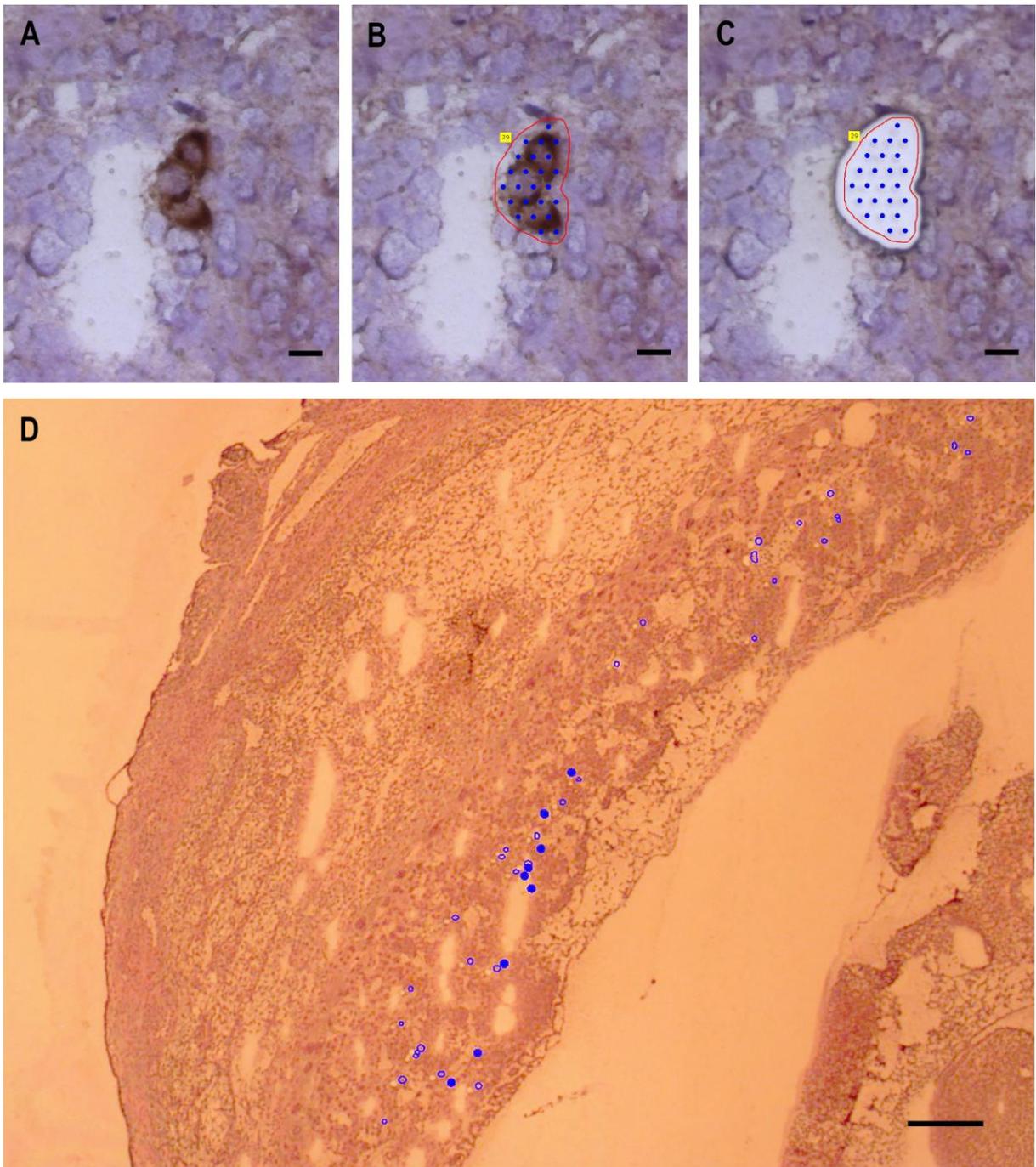


Figura 4.12.1. Microdissecção a laser de células CD41⁺ da região de labirinto da placenta de camundongos. (A-C) Imagens capturadas durante a microdissecção a laser mostrando a localização das células CD41⁺ (A), seguida da delimitação da área de interesse com a ferramenta *free-hand* do PALM RoboSoftware (B). Espaço branco representa a área capturada enquanto o tecido adjacente permanece intacto após a microdissecção (C). **(D)** Imagem de um sítio implantacional após a microdissecção a laser, no qual os círculos representam áreas selecionadas/ capturadas. Barra A-C= 40µm; D= 800 µm.

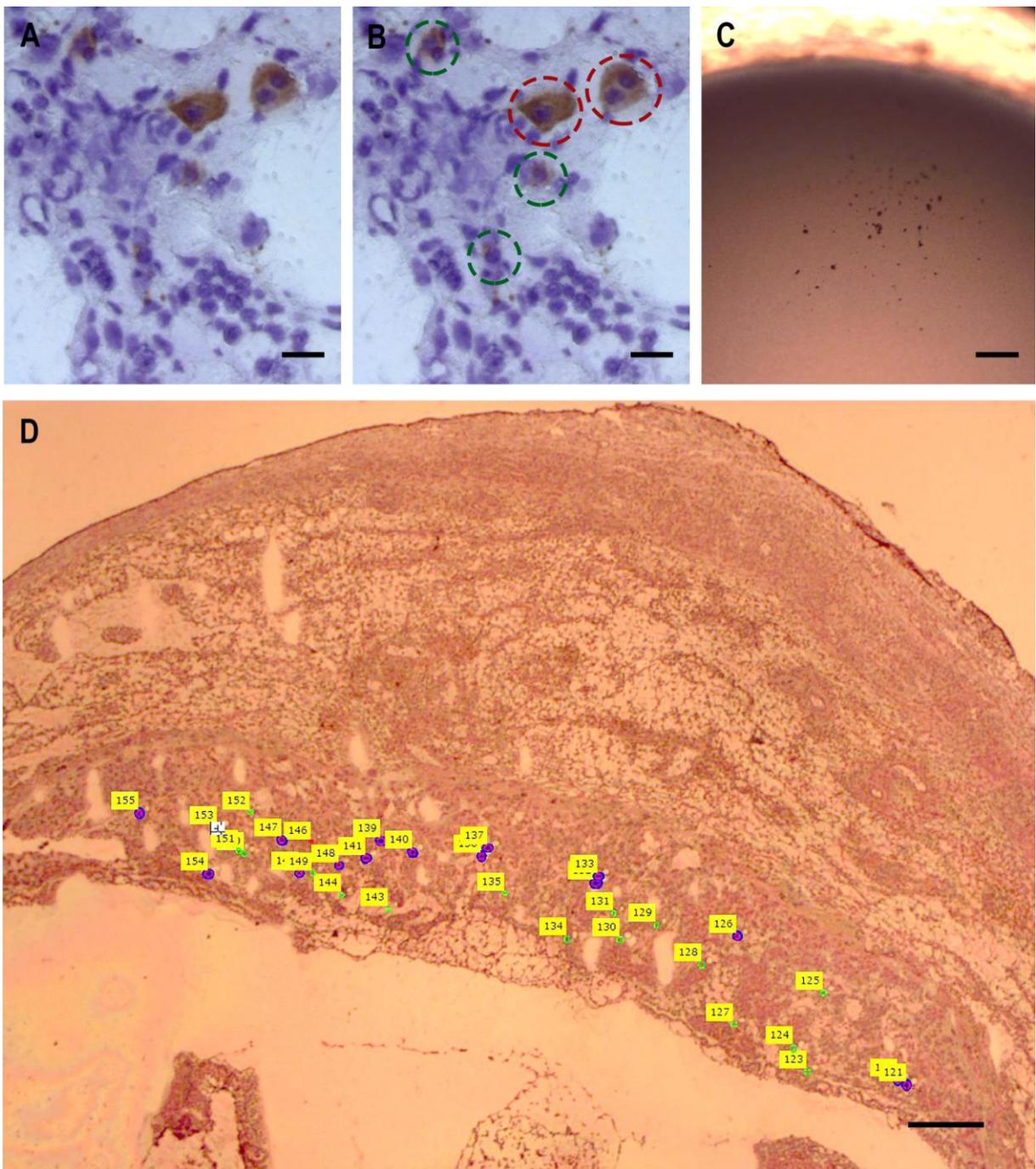


Figura 4.12.2. Captura de duas subpopulações de células CD41⁺ por microdissecção a laser. (A, B) O critério de separação das duas subpopulações de células CD41⁺ foi baseado na morfologia. Células grandes correspondem à população *cluster* (círculo vermelho) e células pequenas correspondem à população *single cell* (círculo verde). (C) Imagem da tampa do tubo coletor mostrando as células capturadas após o procedimento. (D) Distribuição espacial das duas subpopulações de células CD41⁺, aonde o círculo verde representa áreas de *single cell* que foram capturadas enquanto o círculo azul representa áreas de *clusters* capturados. Barra A, B= 60µm; C, D= 800 µm.

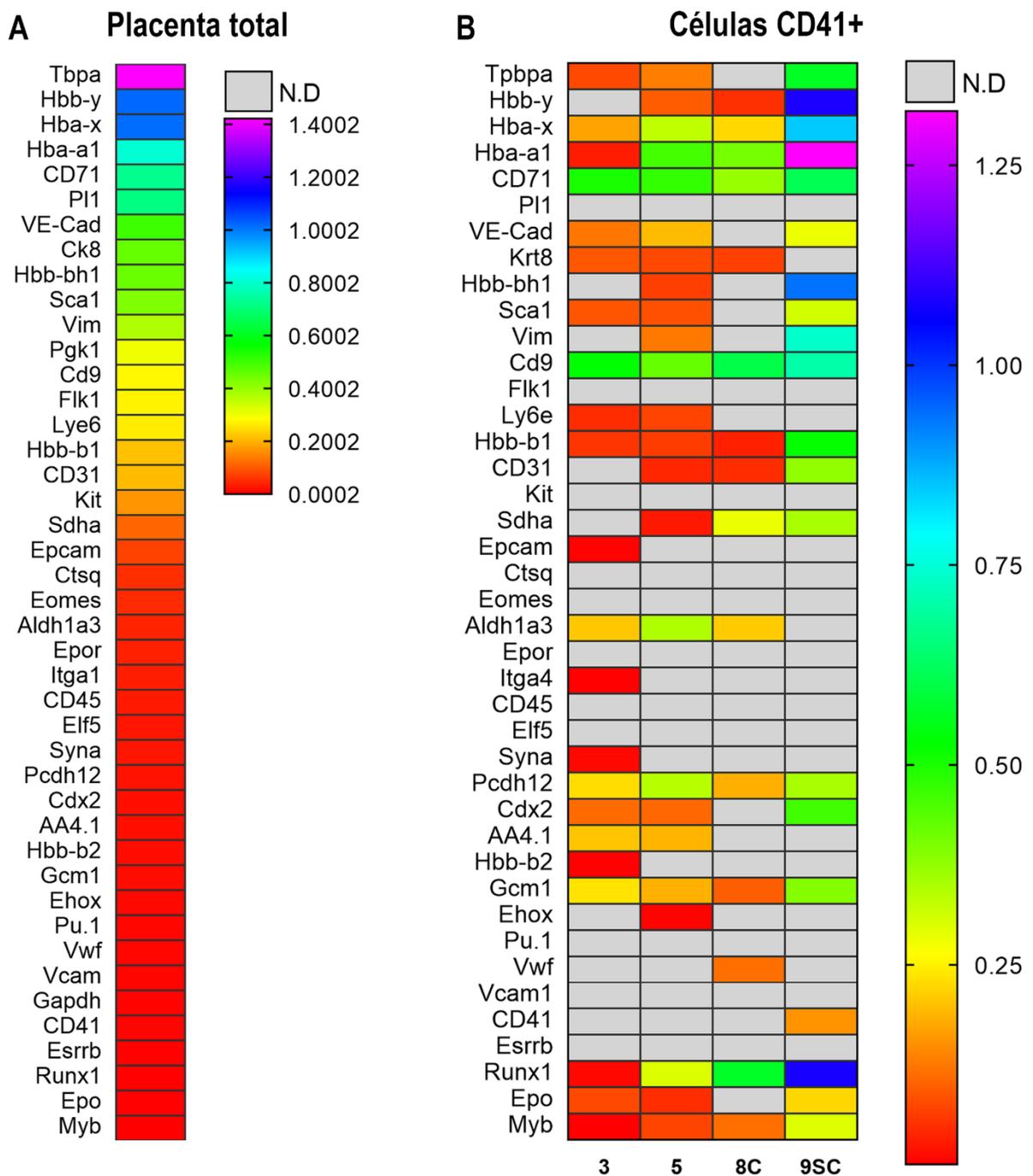


Figura 4.12.3. Heatmaps representativos de todos os genes. (A) *Heatmap* representativo da placenta de camundongos controle Swiss Webster. (B) *Heatmap* representativo de todos os genes-alvo utilizados nas duas amostras de células CD41+ microdissecadas da região do labirinto (3 e 5) e de duas subpopulações morfologicamente diferentes (8C e 9SC). Os valores representados no *heatmap* são: Log10 +1 da Expressão Normalizada (*Pgk1*).

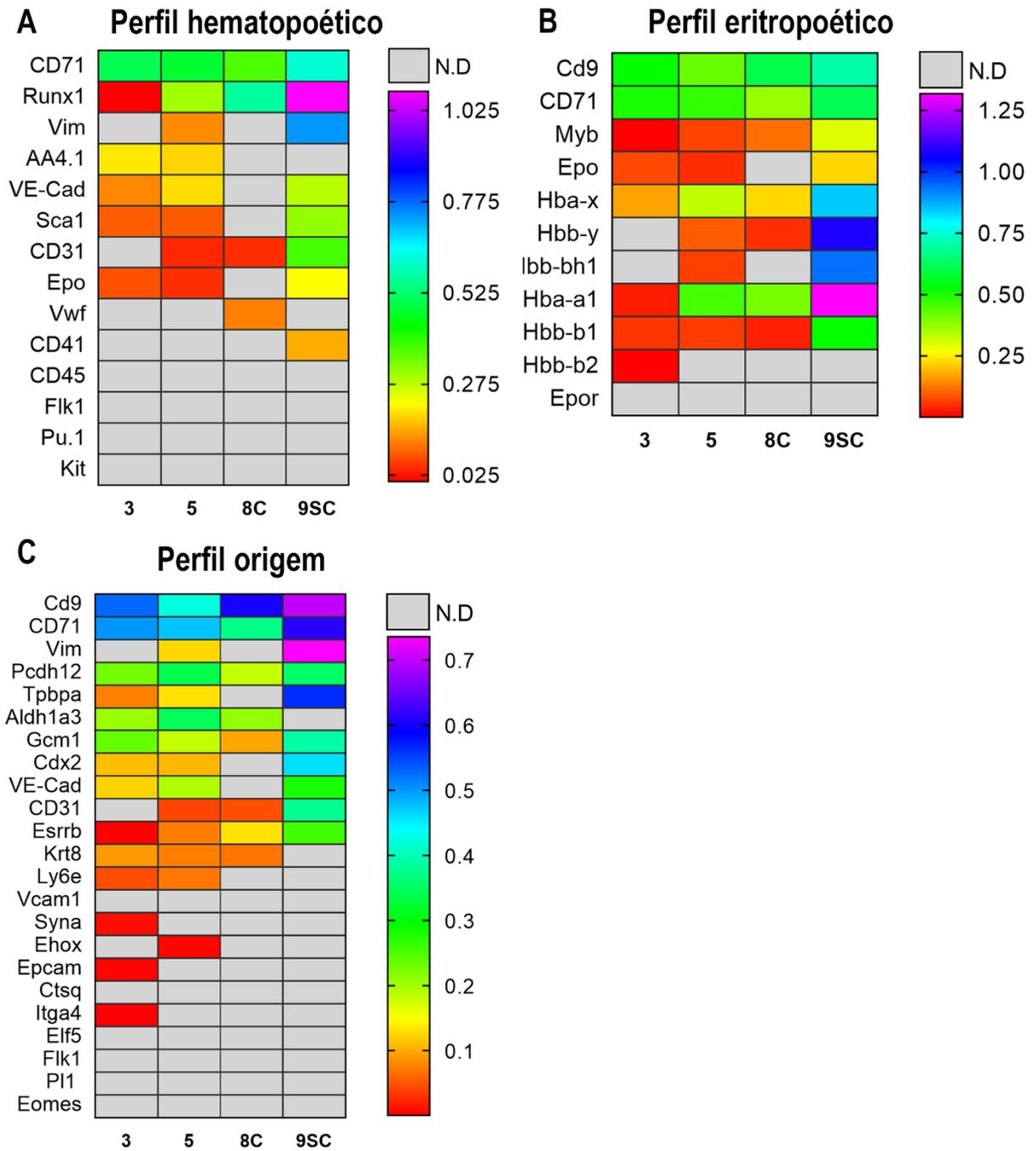


Figura 4.12.4. Heatmaps representativos dos perfis gênicos. Heatmap representativo do perfil hematopoético (A) perfil eritropoético (B) perfil origem (C) das células CD41⁺ microdissecadas da região do labirinto (3 e 5) e de duas subpopulações morfologicamente diferentes (8C e 9SC). Os valores representados no heatmap são: Log₁₀ +1 da Expressão Normalizada (*Pgk1*).

5 DISCUSSÃO

Existe grande interesse em estudar as células tronco hematopoéticas (CTH) devido a sua importância para a homeostase dos organismos adultos e o impacto terapêutico que estas células possuem para diversas doenças hematológicas (Bordignon, 2006). Apesar dos avanços na identificação e regulação das CTH nos indivíduos adultos, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares que controlam a formação e diferenciação das CTH durante a vida embrionária (Chhabra et al, 2012; Martinez-Agosto et al, 2007). Além de serem formadas em diferentes tempos e locais anatômicos, as CTH embrionárias precisam passar por um processo de maturação para adquirir as mesmas características de *homing* e autorrenovação das CTH adultas. Durante a maturação, ocorre proliferação e mudanças na expressão gênica das CTH, determinados por mecanismos celulares intrínsecos e influenciados por sinais do microambiente (Mikkola & Orkin, 2006; Rhodes et al, 2008). A hematopoese embrionária ocorrendo em múltiplos sítios facilita a distribuição de sinais que induzem tanto a produção do *pool* de células em estado indiferenciado quanto a diferenciação das células tronco e progenitores hematopoéticos (CTPH) em células maduras para o embrião em desenvolvimento (Mikkola & Orkin, 2006). Ao mesmo tempo, a existência de múltiplos sítios hematopoéticos embrionários torna mais complexa a investigação da contribuição de cada um deles na produção e desenvolvimento das CTPH.

Diferentes grupos avaliaram a frequência, o potencial de diferenciação e a capacidade de reconstituição da hematopoese *in vivo* das CTPH nos diferentes sítios embrionários e em diversas idades gestacionais. Mesmo utilizando diferentes metodologias, os autores observaram que a frequência de progenitores imaturos enriquecidos com CTH na placenta de camundongos entre 10,5 e 13,5 dg era muito maior do que a frequência destas células nos outros órgãos, incluindo saco vitelínico, AGM e fígado fetal (Alvarez-Silva et al, 2003; Gekas et al, 2005; Ottersbach & Dzierzak, 2005). Especulações para o grande *pool* de CTH na placenta incluíram a produção maciça de CTH pela placenta, a constituição de um microambiente favorável à expansão simétrica das CTH produzidas *in situ* e/ ou oriundas de outros sítios hemogênicos, ou ainda um sítio favorável para a maturação dos pré-CTH recém-formados (Mikkola & Orkin, 2006). Como a expansão de CTH da placenta foi mais acentuada do que a expansão relativa dos seus progenitores

clonogênicos, os autores sugeriram que estava ocorrendo expansão simétrica das CTH na placenta e provável maturação em CTH com propriedades de transplante das células adultas (Gekas et al, 2005). Com base nesses resultados e em trabalhos posteriores que utilizaram diferentes métodos para estudar a hematopoese na placenta, diversos autores atualmente sugerem que a placenta produz pelo menos uma parte das CTPH encontradas *in situ*, além de proporcionar um microambiente favorável à expansão sem induzir a diferenciação destas células e das CTPH oriundas de outros locais (Chhabra et al, 2012; Rhodes et al, 2008; Sasaki et al, 2010).

Apesar de a placenta constituir um sítio hematopoético potencialmente importante para estabelecer o pool de células tronco antes da etapa de diferenciação no fígado fetal, ela é um órgão pouco explorado nesse contexto. Sendo assim, pouco se conhece sobre o perfil das células hematopoéticas da placenta e o nicho celular e molecular que controlam a expansão e mobilização destas células. Ainda, pouco se sabe sobre o processo de formação das CTPH *in situ*, seus progenitores ou a sua contribuição para a hematopoese pós-natal. Limitações técnicas para estudar o tecido placentário após o estabelecimento da circulação sanguínea somadas à ausência de marcadores celulares que distinguem as CTH formadas nos diferentes sítios hematopoéticos que se sobrepõem, faz com que os resultados obtidos até o momento sejam controversos (Cañete et al, 2017).

Para abordar essas e outras questões, nos propusemos a realizar uma análise sistemática da placenta de camundongos durante a metade da gestação para avaliar a presença de sítios de atividade hematopoética, caracterizando as populações celulares encontradas e sua topografia neste órgão, bem como o nicho hematopoético. Dados histológicos obtidos pelo nosso grupo localizaram arranjos hematopoéticos na placenta de camundongos SW nas idades gestacionais de 10,5 e 11,5 dg, além de focos de eritropoese placentária semelhantes aos hemangioblastos das ilhotas sanguíneas do saco vitelínico (Portilho, 2013). Ao longo do doutorado, decidimos aprofundar esses achados, aumentando o número de placentas analisadas por idade gestacional e utilizando outras linhagens de camundongos, para descrever as etapas de formação das células sanguíneas na placenta. Confirmamos a existência de hematopoese *in situ* na placenta, a qual parece ser restrita às idades gestacionais de 10,5 e 11,5 dg, em um processo conservado entre diferentes linhagens de camundongos. Além disso, observamos a formação de CTH

por mecanismos distintos que parecem ocorrer ao mesmo tempo em nichos diferentes dentro da região de labirinto. Nesta região, a placenta parece produzir CTH na placa coriônica e nos vasos sanguíneos adjacentes de forma semelhante à hematopoese definitiva, mas também parece produzir células hematopoéticas imunoblastoides por brotamento dos vasos fetais da área oposta próxima à zona de junção (Portilho et al, 2016). Observamos ainda, uma heterogeneidade de células hematopoéticas imaturas na placenta, o que pode refletir as diferentes origens destas células, por exemplo progenitores eritromieloides do saco vitelínico e CTH. Entretanto, a presença de *clusters* de células heterogêneas e duplas marcações, sugerem que, mais do que um local para a expansão das CTH, a placenta parece contribuir para a maturação destas células e talvez ainda, iniciar a diferenciação eritroide de alguns progenitores antes do fígado fetal.

Foi observada também a transição epitélio-mesenquimal de células espongiotrofoblásticas da zona de junção, que diminuía a expressão de citoqueratina e começavam a expressar os marcadores mesenquimais vimentina e CD31. Células em transição foram observadas em arranjos sugestivos de diferenciação vascular, próximos a células hematopoéticas expressando vimentina que brotavam de tais vasos. A vasculogênese e a hematopoese foram exploradas pelo uso de camundongos *knockout* para o gene *Pgf*, um fator de crescimento vascular da mesma família do VEGF, que ajudaram a entender o fenômeno proposto aqui de que linhagens endoteliais e hematopoéticas podem surgir *de novo* a partir de componentes celulares na camada de espongiotrofoblasto. Nesse sentido, sugerimos que na região distal da placenta murina ocorre a produção de eritrócitos nucleados e vasculogênese, vasos estes com potencial de endotélio hemogênico, como acontece no saco vitelínico. À medida em que os vasos formados nessa região crescem, eles se juntam aos vasos que chegam oriundos da alantoide para estabelecer a rede vascular fetal da região de labirinto, assim como acontece nas vilosidades da placenta humana (Aplin et al, 2015). Para ajudar na compreensão do processo de vasculogênese e hematopoese na placenta, estudamos o perfil de expressão gênica das células imaturas CD41⁺ da placenta, buscando evidências moleculares da sua origem embrionária, grau de diferenciação e persistência pós-natal.

5.1 Visualização e caracterização das células hematopoéticas na placenta de camundongos

Os eritrócitos nucleados foram o tipo celular mais abundante na circulação fetal da placenta, embrião e saco vitelínico, enquanto células hematopoéticas imaturas foram observadas em menor quantidade em todas as idades gestacionais analisadas. Apesar da natureza migratória das células sanguíneas, as células imaturas raramente foram observadas circulando nos vasos sanguíneos do feto, sendo mais abundantes nos vasos estreitos da placenta entre 10,5 e 11,5 dg. Embora menos comum nessas idades gestacionais, uma maior quantidade de células imaturas também se acumulou em vasos do saco vitelínico próximos à placenta ou no fígado fetal, indicando que, de fato, as CTPH se localizam preferencialmente nos sítios hematopoéticos do que na circulação sanguínea (Mikkola & Orkin, 2006; Wright et al, 2001). Nas placentas com 10,5 e 11,5 dg, as células imaturas foram observadas não só circulando nos vasos fetais, mas também organizadas em arranjos hematopoéticos distribuídos em áreas diferentes dentro da região de labirinto, que sugerem que a placenta produz células hematopoéticas heterogêneas por pelo menos dois mecanismos distintos, os quais ocorrem ao mesmo tempo e cujos precursores não são os mesmos.

5.1.1 Hematopoese na placa coriônica e nos vasos fetais do labirinto próximos a essa região

Foram observados raros brotamentos intraluminais de células hematopoéticas imaturas a partir do endotélio dos vasos sanguíneos da placa coriônica e em vasos maiores da região de labirinto próxima a esta. Brotamentos semelhantes foram previamente identificados na porção ventral da aorta dorsal de camundongos aos 10,5 dg e, uma vez que experimentos adicionais revelaram que os *clusters* intraórticos eram CTH, tais brotamentos passaram a representar a ocorrência de hematopoese definitiva (Bertrand et al, 2005; Godin & Cumano, 2002). Além disso, a natureza imatura dos *clusters* na placenta foi confirmada pela positividade destas células ao anticorpo anti-CD41 após a imunofluorescência em *whole mount*. As células CD41⁺ encontravam-se aderidas à parede de um vaso largo, evidenciado pelo anticorpo anti-CD31. Entretanto, as células que brotavam na placenta foram negativas para CD31, apesar de relatos na literatura de que as células formadas no endotélio hemogênico da aorta dorsal retém a expressão deste marcador durante as

etapas iniciais do brotamento (Boisset et al, 2010; Yokomizo & Dzierzak, 2010), o que também foi encontrado no nosso material. É possível que as células dos *clusters* da placenta também expressem CD31 mas de forma menos intensa do que o CD41, de modo que a dupla-marcação não tenha sido detectada pelo microscópio de fluorescência convencional em que foram analisadas.

Células morfológicamente semelhantes às que compunham os *clusters* também foram observadas circulando sozinhas nos vasos fetais de toda extensão do labirinto. Assim como nos *clusters*, estas células individuais também expressavam CD41, e ainda foram positivas para o marcador de células hematopoéticas da linhagem definitiva, Runx1. Apenas células hematopoéticas circulantes expressaram Runx1 e estas células Runx1⁺ foram mais frequentes nos vasos intraembrionários do que nos vasos da placenta. A imunohistoquímica em camundongos Runx1-LacZ *knock-in* aos 10,5 e 11,5 dg corados com β -Galactosidase, evidenciou a expressão de Runx1 não só nas células hematopoéticas, como também no mesênquima e no endotélio da placa coriônica e células endoteliais da aorta, principalmente na porção ventral, sugerindo semelhanças entre as duas estruturas (Ottersbach & Dzierzak, 2005). Em nosso material, além de expressar CD31 e vimentina, como todos os outros vasos fetais da região de labirinto, algumas células endoteliais dos vasos da placa coriônica e vasos fetais do labirinto próximos a esta, e apenas neste local, foram positivos também para c-Kit, assim como algumas células imaturas que circulavam no interior destes vasos. Células endoteliais da aorta dorsal também expressaram c-Kit, enquanto o endotélio do saco vitelínico e de outros vasos menores do feto foram negativos. Devido às semelhanças, acreditamos que os *clusters* hematopoéticos formados nessa região específica da placenta sejam semelhantes às CTH formadas no assoalho aórtico. Sendo assim, a atividade hematopoética dos grandes vasos embrionários (Yokomizo & Dzierzak, 2010) se estenderia aos vasos proximais da placenta.

Tanto a aorta dorsal quanto os vasos fetais da placenta se formam a partir de tecido mesodérmico, sendo originados do mesoderma lateral ou da alantoide respectivamente. Uma vez que a alantoide de aves e camundongos têm potencial hematopoético, Sasaki e colaboradores injetaram corante CM-Dil na base da alantoide de camundongos aos 8,25 dg e mantiveram os embriões em cultura por dois dias. Os autores observaram que os clusters c-Kit⁺ também eram positivos para o corante (Sasaki et al, 2010). Apesar de os autores sugerirem a diferenciação direta

do mesoderma em células hematopoéticas, nós e outros autores acreditamos na existência de um endotélio hemogênico intermediário que expresse marcadores comuns às CTH formadas nessa região, como Runx1 (Ottersbach & Dzierzak, 2005), CD31, VE-caderina, CD34 (Rhodes et al, 2008) e agora o c-Kit. O acúmulo de células positivas para estes marcadores corrobora a topografia de formação das CTH na placenta sugerida por nós.

O Fator de von Willebrand (vWF) foi outro marcador presente nos vasos intraembrionários, incluindo a aorta dorsal, e que na placenta foi expresso exclusivamente nos vasos da placa coriônica sendo negativo para demais vasos fetais do labirinto. O vWF é uma glicoproteína presente em megacariócitos, plaquetas e endotélio. Este fator, também conhecido como antígeno relacionado ao Fator VIII (F-VIII-RA) tem um papel central na homeostase ao mediar a agregação plaquetária (Sanjuan-Pla et al, 2013). Em nosso estudo, algumas células hematopoéticas imaturas também expressaram fortemente esse fator. Recentemente, foram identificadas CTH na medula óssea de camundongos adultos que expressam vWF. As CTH vWF⁺ da medula óssea exibiram capacidade de diferenciação mieloide e de reconstituição da hematopoese a longo prazo muito maior do que as células vWF⁻, e com uma produção robusta de plaquetas; enquanto as CTH vWF⁻ produziam essencialmente linfócitos (Sanjuan-Pla et al, 2013). Ainda, transplantes seriados em camundongos irradiados revelaram que as CTH vWF⁺ produziam os dois tipos de CTH, vWF positivas ou negativas, enquanto o inverso foi raramente observado, revelando uma hierarquia entre essas duas populações celulares (Knapp & Eaves, 2014; Sanjuan-Pla et al, 2013; Woolthuis & Park, 2016). Progenitores hematopoéticos vWF positivos foram identificados por citometria de fluxo no fígado fetal de camundongos aos 14,5 dg e essa população de CTH era mais frequente no feto do que na vida adulta (Sanjuan-Pla et al, 2013), sugerindo um mecanismo de diferenciação no fígado fetal. Neste trabalho, identificamos raras células vWF positivas aos 9,5 dg, cuja frequência aumentou aos 10,5 e 11,5 dg, tanto na placenta quanto na circulação sanguínea e no fígado fetal, decaindo na placenta após 12,5 dg. Sendo assim, é possível que as CTH mantenham a expressão fenotípica de vWF durante o brotamento a partir do endotélio hemogênico também vWF⁺. As CTH recém-formadas também poderiam adquirir esse fator ao longo do processo de maturação e diferenciação, possivelmente durante a maturação no fígado fetal. Alternativamente, as CTH formadas em diferentes sítios

embrionários poderiam constituir uma população heterogêneas de células-tronco. Neste estudo não identificamos brotamentos intraluminais contendo células vWF⁺, apesar de já termos identificado o brotamento de célula imunoblastoide única a partir de vaso fetal vWF⁻ da porção mais distal da placenta (Portilho et al, 2016).

Outros genes da linhagem megacariocítica foram identificados nas CTH como CXCR4 e CD150 e o próprio CD41, que já é um marcador estabelecido para as CTPH durante a vida embrionária (Mikkola et al, 2003; Robin et al, 2011). Sendo assim, o comprometimento das CTH com a linhagem megacariocítica, que acreditava-se ser no final da cascata de diferenciação hematopoética, pode ocorrer em etapas mais iniciais do desenvolvimento, como em um atalho na rota de diferenciação das CTH em megacariócitos. Já foi sugerida a produção de megacariócitos durante a hematopoese primitiva mas tais células ainda não foram identificadas *in situ* e nem a produção plaquetária foi observada antes de 10,5 dg (Tober et al, 2007). Sendo assim, as células isoladas do saco vitelínico e com grande potencial megacariocítico poderiam representar os progenitores definitivos positivos para vWF com grande potencial megacariocítico que, apesar de serem descritos em adultos (Sanjuan-Pla et al, 2013), nunca haviam sido descritos durante o desenvolvimento embrionário antes de 14,5 dg.

Apesar dos arranjos hematopoéticos terem sido localizados essencialmente aos 10,5 e 11,5 dg, raras células hematopoéticas vWF ou vimentina positivas foram observadas nos vasos embrionários e extraembrionários aos 9,5 dg, incluindo os vasos do labirinto em desenvolvimento. Nessa idade, poucas células endoteliais da aorta dorsal ou da placa coriônica expressaram vWF, e as células positivas poderiam ser eritroblastos ou progenitores hematopoéticos produzidos no saco vitelínico durante a primeira ou segunda onda hematopoética, respectivamente. A intensidade de vimentina nas células circulantes também foi menor, e poderia representar as mesmas células. Estas células poderiam estar migrando do saco vitelínico para a placenta para expansão e maturação antes do fígado fetal. Também aos 9,5 dg foi observado um aglomerado de células vimentina fortemente positivas na parede dos vasos da placa coriônica. Devido às semelhanças morfológicas destes arranjos com as células mesenquimais da placa coriônica, principalmente na intensidade de marcação e arranjo nuclear, é possível que estes arranjos mesenquimais participem do processo de vasculogênese no labirinto. Aglomerados

semelhantes de células CD31⁺ foram observados na placenta de embriões Ncx1^{-/-} da mesma idade, que carecem de batimentos cardíacos (Rhodes et al, 2008).

5.1.2 Hematopoese nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção

Células imaturas heterogêneas entre si e morfologicamente diferentes das células descritas anteriormente foram frequentemente observadas nos vasos fetais do labirinto, principalmente os mais distais próximos à zona de junção. Destas, as células grandes imunoblastoides foram o fenótipo mais comum e normalmente estavam em grupos de células homogêneas ou formando *clusters* com outras células imaturas. Estas células não eram apenas morfologicamente heterogêneas entre si, mas também tinham diferentes afinidades aos anticorpos hematopoéticos utilizados. Na análise de imunofluorescência, nenhuma destas células expressou c-Kit ou Runx1, assim como a maioria das células imaturas foram negativas ao CD31. Trabalhos anteriores detectaram por citometria de fluxo progenitores hematopoéticos na placenta dentro da população CD31 positiva (Ottersbach & Dzierzak, 2005; Sasaki et al, 2010). *Clusters* de células CD31 positivas também foram identificados previamente por imunofluorescência no labirinto da placenta (Sasaki et al, 2010). Entretanto, como nestes trabalhos as células que foram positivas para CD31 coexpressavam c-Kit, nós acreditamos que tais *clusters* sejam os mesmos descritos por nós em vasos próximos à placa coriônica e compostos por células menores e homogêneas, mas não nos vasos distais do labirinto.

Em nosso estudo, foram encontradas células imaturas heterogêneas positivas e negativas para os marcadores vimentina ou vWF. Em contrapartida, o marcador hematopoético CD41 pareceu abranger todas as populações de células imaturas na placenta, embora tenha sido expresso em diferentes intensidades entre as células. Isso porque nas marcações duplas de CD41 com vimentina ou vWF, além de células duplo-positivas (CD41⁺vimentina⁺ ou CD41⁺vWF⁺) foram encontradas também células positivas apenas para o CD41 (CD41⁺vimentina⁻ ou CD41⁺vWF⁻). Os *clusters* formados por células imunoblastoides e células heterogêneas também foram positivos para Sca1, apesar de não termos identificado células Sca1 positivas nos *clusters* de células homogêneas da placa coriônica (Portilho et al, 2016).

A heterogeneidade de progenitores hematopoéticos na placenta nos fez questionar a hipótese levantada por muitos autores de que a placenta seria um ambiente propício para a expansão e amadurecimento das CTH, originadas *in situ*

ou oriundas de outros locais, sem induzir a sua diferenciação. Os arranjos de células heterogêneas pode indicar que na placenta esteja ocorrendo: a) expansão e amadurecimento das células hematopoéticas que aumentam o pool de CTPH transplantáveis antes da diferenciação no fígado fetal, como foi previamente sugerido; b) as células heterogêneas poderiam representar células oriundas de diferentes sítios hematopoéticos e, talvez, com diferentes potenciais de diferenciação; ou c) além da expansão e maturação, estaria ocorrendo o início da diferenciação de CTH do topo da hierarquia hematopoética em diferentes precursores. A complexidade dos marcadores de superfície das CTH torna difícil estudar a evolução progressiva destas células de um estágio de desenvolvimento ou de um nicho para outro. Entretanto, alguns marcadores descritos foram relacionados com o grau de maturação das células hematopoéticas e podem ajudar na interpretação dos resultados (Mikkola, 2009; Mikkola & Orkin, 2006).

Por exemplo, a ausência de CD31 associada à diminuição de expressão do CD41 (fenotipicamente menos intenso nas células imunoblastoides dos *clusters*), bem como a expressão de Sca1, são mudanças nos marcadores de superfície compatíveis com células em maturação. Entretanto, outras combinações de marcadores podem sugerir que as diferentes células imaturas da placenta possuem diferentes origens embrionárias ou encontram-se em processo de maturação e diferenciação. O c-Kit é um marcador expresso em todas as células tronco e progenitores hematopoéticos e permanece na superfície das CTH inclusive na vida adulta. Uma vez que todas as populações de células hematopoéticas transplantáveis encontram-se na população celular positiva para c-Kit, a ausência desse marcador nas células imunoblastoides da placenta pode indicar um processo de diferenciação. A ausência do Runx1 também pode indicar o início de comprometimento das células negativas com determinada linhagem. Ao mesmo tempo, o Runx1 é transcrito em progenitores hematopoéticos da linhagem definitiva e sua ausência pode indicar que as células imaturas analisadas da placenta que não expressaram esse transcrito seriam progenitores da linhagem primitiva.

Células positivas ou negativas para vWF podem representar diferentes origens. Em outra interpretação, as CTH vWF⁺ poderiam estar proliferando e também se diferenciando na população de células vWF⁻, como foi descrito nas CTH adultas (Sanjuan-Pla et al, 2013), gerando então as duas populações de CTH da medula óssea. Alternativamente, as células vWF⁺ poderiam ser progenitores de

megacariócitos. Entretanto, resultados de expressão gênica, que serão discutidos a seguir, sugerem uma perda progressiva de CD41 concomitante ao ganho de vWF, o que não condiz com uma diferenciação megacariocítica, aonde ambos os marcadores persistem.

A vimentina, que não é comumente usada para identificar células hematopoéticas por não ser exclusivamente expressa nestas células, se mostrou bastante útil nesse estudo para observar a diferenciação celular e topografia. Os filamentos intermediários de vimentina são expressos em todos os precursores hematopoéticos, mas a sua organização e densidade diferem significativamente entre as linhagens celulares (Dellagi et al, 1983). Sendo assim, os padrões de expressão de vimentina entre as células hematopoéticas da placenta são altamente sugestivos de expansão com diferenciação celular. Ainda, a distribuição de células vimentina positivas nos vasos do labirinto da placenta ajudou a representar a topografia das células hematopoéticas, com acúmulo das células imaturas de maior intensidade de marcação nos vasos próximos à zona de junção. Apesar de diferentes intensidades de vimentina no citoplasma, praticamente todas as células hematopoéticas expressaram CD41, indicando que, ainda que ocorra diferenciação, as células filhas retêm as propriedades de uma célula imatura.

Não obstante a teoria monofilética das CTH na medula óssea seja a mais aceita pela comunidade científica, a existência de um pool de CTH de longo prazo funcionalmente diferente tem se tornado cada vez mais popular (Woolthuis & Park, 2016; Benz et al, 2012; Ema et al, 2014). Ainda que a heterogeneidade entre as CTH adulta esteja sendo cada vez mais definida, como isso se estabelece ao longo do desenvolvimento da hematopoese ainda não foi explorado. Os dados apresentados aqui sugerem que as células tronco hematopoéticas sofrem expansão e maturação no nicho placentário, além de dar início à diferenciação em CTPH com diferentes propriedades. Acreditamos que estes progenitores irão migrar para o fígado fetal, onde estabelecem pequenas colônias de diferenciação hematopoética, e que, no final da gestação, irão migrar para a medula óssea e se estabelecer em micronichos com propriedades diferentes. A presença de células imunoblastoides no fígado foi previamente documentada (Ayres-Silva et al, 2011). Em nosso material, células vimentina⁺ foram observadas entre os cordões hepáticos, mas sem aparente formação de colônias, o que é observado, de fato, a partir de 11,5 dg (Morrison et al,

1995). Grupos de células vWF⁺ e heterogêneas entre si também foram observados por nós no fígado fetal aos 10,5 dg.

5.1.3 Eritropoese nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção

Além de formar um pool de diferentes células tronco e precursores hematopoéticos, encontramos indícios de que na placenta também ocorre diferenciação eritropoética. Evidências de eritropoese foram descritas na placenta de macacos (Jollie et al, 1975) e na placenta humana durante o primeiro trimestre da gestação (Aplin et al, 2015; Challiera et al, 2005), mas nunca haviam sido identificadas em camundongos. Em nosso material, encontramos focos eritropoéticos na região de labirinto próxima à zona de junção de placentas com 10,5 e 11,5 dg. Estes focos consistiram em aglomerados de células imunoblastoides e células eritroides em diferentes estágios de maturação, indicado pelas diferentes tonalidades do citoplasma corado por HE ou Giemsa e diferentes perfis nucleares, muitas vezes exibindo nucléolos proeminentes como os da célula imunoblastoide. Assim como observado na placenta humana, os focos eritropoéticos maciços coexistiam com focos contendo células ainda aderidas entre si, porém mais soltas no interior de um lúmen vascular. Além disso, observamos a descontinuidade e heterogeneidade do endotélio de camundongos na porção distal. Em humanos, o endotélio ao redor de alguns focos eritropoéticos também era descontínuo e, por isso, foi relacionado à concomitante diferenciação vascular e eritropoética assim como ocorre no saco vitelínico (Aplin et al, 2015; Challiera et al, 2005).

De fato, os focos eritropoéticos encontrados por nós em camundongos são bastante semelhantes àqueles descritos na placenta humana, os quais foram chamados de focos hemangioblásticos pelos autores devido à semelhança com as ilhotas sanguíneas do saco vitelínico durante a hematopoese (Aplin et al, 2015; Cumano & Godin, 2007; Palis & Yoder, 2001; Portilho et al, 2016). Outras similaridades com a eritropoese primitiva incluíram a ausência de progenitores intermediários da cascata de diferenciação eritropoética definitiva, ausência das ilhotas eritroblásticas e a retenção do núcleo pelos eritrócitos recém-formados e liberados na corrente sanguínea (Fraser, 2013). Sendo assim, sugerimos que as células imaturas imunoblastoides se diferenciam em eritroblastos na porção terminal do labirinto, e que as células recém-formadas vão perdendo progressivamente a expressão de moléculas de adesão, enquanto são liberadas no vaso recém-

formado. Como ocorre nas vilosidades da placenta humana, os vasos formados nessa porção distal da placenta crescem em direção do labirinto, orientados de forma a se unir com a rede vascular que se desenvolve a partir da placa coriônica e cujos vasos se originam do mesênquima da alantoide. Diversos fatores angiogênicos são produzidos por células da placenta, os quais poderiam guiar o crescimento dos vasos do labirinto (Ribatti et al, 2009). Entre eles, o VEGF, que localizamos em várias células trofoblásticas nesta idade e células imaturas na circulação fetal do labirinto

Os eritrócitos maduros dos focos eritropoéticos e outros que circulavam em vasos próximos à zona de junção, sem estarem organizados em focos, exibiram um fenótipo mais imaturo do que eritrócitos encontrados em outros vasos embrionários e extraembrionários. Além de realizarem numerosas mitoses, estes eritroblastos eram mais globosos, com superfície regular, e núcleo reticulado. Considerando que os eritroblastos primitivos do saco vitelínico sofrem um processo de amadurecimento semi-sincrônico após serem liberados na circulação sanguínea (Fraser et al, 2007), os eritrócitos mais globosos nos parecem mais imaturos e, por isso, poderiam representar uma fonte adicional de eritrócitos primitivos originados na placenta. Sendo assim, eritrócitos nucleados da placenta se somariam aos eritrócitos primitivos do saco vitelínico para suprir a demanda de oxigênio do feto em crescimento. Seria interessante investigar se os eritrócitos da placenta possuem hemoglobinas embrionárias como os do saco vitelínico, pois estas se ligam com maior afinidade ao oxigênio, o que seria importante no ambiente de hipóxia dessa fase.

As células da placenta produzem uma série de hormônios e fatores de crescimento que podem induzir a hematopoese, incluindo a eritropoese, e podem justificar a ocorrência de diferenciação hematopoética *in situ*. Em particular, identificamos duas moléculas expressas por células trofoblásticas e maternas na porção distal da placenta, que poderiam facilitar a ocorrência de eritropoese nessa região específica do labirinto. Uma delas é a hepcidina²⁵, uma molécula importante para a homeostase e transferência do ferro, que, por sua vez, é necessária para formar o grupamento heme da hemoglobina dos eritrócitos (Ganz & Nemeth, 2012). A hepcidina²⁵ foi localizada em algumas células trofoblásticas gigantes da camada parietal e algumas células da decídua, e poderia contribuir para o nicho eritropoético próximo à essas células. A hepcidina-25 também está presente no endoderma do

saco vitelínico, sugerindo que a eritropoese nos dois sítios extraembrionários pode ocorrer por mecanismo semelhante.

Algumas células espongiotrofoblásticas e CTG, bem como a maioria das células uNK, continham EPO (Benz et al), um hormônio glicoproteico cuja função principal é induzir a diferenciação de progenitores eritropoéticos, controlando sua proliferação, maturação e sobrevivência (Rossert & Eckardt, 2005). Esse hormônio é normalmente produzido em resposta à hipóxia e exerce suas funções através do seu receptor específico, EPO-R (Ji et al, 2011; Rossert & Eckardt, 2005). A EPO é produzida nos rins de indivíduos adultos, enquanto sua produção durante a vida embrionária acontece no fígado fetal e nas células endodérmicas do saco vitelínico visceral (Ebert & Bunn, 1999; Koury et al, 1991; Yasuda et al, 2002). A expressão de EPO foi também descrita no citotrofoblasto viloso e extraviloso da placenta humana em diferentes idades gestacionais (Conrad et al, 1996; Ji et al, 2011; Kowalska-Kańka et al, 2013), cuja expressão é acentuada em patologias gestacionais (Toth et al, 2008). Em camundongos com 13,5 dg foi demonstrada a ocorrência de eritropoese ectópica nos vasos do labirinto em decorrência do aumento da expressão de eritropoetina pelas células trofoblásticas na ausência de sinalização por PDGF-B (do inglês *Platelet Derived Growth Factor Subunit B*). Indução de eritropoese semelhante poderia ocorrer de forma natural durante o período anterior de hematopoese na placenta (10,5 e 11,5 dg).

Decidimos testar se a eritropoese placentária seria sensível à eritropoetina exógena. Para isso, realizamos um experimento administrando EPO humana recombinante (rhEPO), nas fêmeas grávidas para verificar o possível aumento de focos eritropoéticos em resposta a esse fator. Desde os anos 1980, a rhEPO vem sendo utilizada no tratamento de pacientes com anemia decorrente de diversas doenças, como insuficiência renal crônica, e beneficia inclusive mulheres grávidas, uma vez que sua administração não causa prejuízos ao feto desde que administrada durante o terceiro trimestre (Braga et al, 1996; Malek et al, 1994; Shi et al, 2013). Não foram encontrados dados na literatura da administração de rhEPO em camundongos grávidas, provavelmente devido a relatos de que essa glicoproteína não atravessa a barreira placentária humana a termo (Malek et al, 1994). Sendo assim, optamos por administrar rhEPO aos 9,5 dg, quando a placenta ainda está se formando, e na expectativa de que esta pudesse atingir a decídua materna e de alguma forma, estimular os focos eritropoéticos da placenta próximos a essa região.

Os sítios implantacionais coletados de duas fêmeas com 11,5 dg, ou seja, dois dias após a injeção de rhEPO não apresentaram diferenças significativas em relação a fêmeas SW de mesma idade gestacional. Os vasos fetais do labirinto continham células imaturas hematopoéticas, mas não foram observados focos eritropoéticos. Os sítios implantacionais de duas fêmeas com 10,5 dg que receberam rhEPO no dia anterior, foram bastante diferentes entre si. Alguns sítios exibiram acúmulo de CTG na interface materno-fetal, as quais podem ser as mesmas células que expressaram fenotipicamente EPO na imunomarcção. Observamos numerosas células imaturas circulando nos vasos fetais do labirinto. Entretanto, apenas três sítios implantacionais exibiram focos eritropoéticos, compostos por células imunoblastoides e eritrócitos formando aglomerados com as células trofoblásticas adjacentes e sem endotélio evidente. Quando presente, tais focos eram frequentes por toda a região de labirinto da placenta em questão. Entretanto, como o número de animais utilizados neste experimento foi pequeno e como não temos nenhum controle interno de que a rhEPO chegou nos sítios implantacionais, não podemos concluir que os focos eritropoéticos foram estimulados pela EPO exógena ou se representaram o fenômeno de eritropoese já existente. Uma vez que este experimento demandava longo tempo para análise e considerando as variações morfológicas entre os sítios implantacionais, optamos por não aprofundá-lo e, ao invés disso, utilizar metodologias adicionais para analisar a eritropoese placentária, como a análise de expressão gênica.

5.1.4 Hematopoese *de novo* nos vasos fetais do labirinto próximos à zona de junção

A formação de células hematopoéticas no saco vitelínico de camundongos ocorre de duas formas e em dois momentos diferentes. Primeiro, são formados células endoteliais e eritrócitos primitivos aos 7,5 dg, a partir de células mesodérmicas conhecidas como hemangioblastos. Logo depois, *clusters* de progenitores mieloeritroides definitivos c-Kit^{hi} emergem do endotélio hemogênico recém-formado, por volta de 8-8,5 dg (Frame et al, 2013). Uma vez que a placenta de camundongos forma focos eritroides morfolologicamente semelhantes às ilhotas sanguíneas do saco vitelínico, imaginamos se o endotélio formado também teria a plasticidade necessária para se diferenciar em células hematopoéticas mais

complexas. Nesse sentido, nos chamou atenção algumas células endoteliais dos vasos ao redor dos focos eritropoéticos cuja coloração e arranjo nuclear lembrava as células imaturas imunoblastoides. Células imunoblastoides também foram observadas projetando-se para o interior da circulação fetal a partir do endotélio adjacente, algumas expressando vWF (Portilho et al, 2016) ou vimentina. As células imunoblastoides poderiam então se formar por brotamento a partir do endotélio hemogênico e logo iniciar o processo de maturação/ diferenciação uma vez que os *clusters* compostos por estas células muitas vezes continham células ainda aderidas ao endotélio adjacente. Somente o estudo morfológico sistemático permitiu perceber diferenças sutis entre as células hematopoéticas imaturas da placenta e distinguir duas formações celulares em nichos distintos, na placa coriônica e na zona de junção, uma vez que ambos acontecem na mesma janela curta de desenvolvimento e compartilham alguns marcadores de superfície.

Devido às semelhanças morfológicas e possíveis propriedades semelhantes do endotélio formado no saco vitelínico e na placenta, não é difícil imaginar que os anexos extraembrionários possam desempenhar funções equivalentes na constituição da hematopoese fetal. Apesar da origem embrionária diferente, células de ambos os tecidos poderiam ter potenciais hematopoéticos iguais que irão se expressar de forma diferente de acordo com a demanda do embrião e possivelmente à tensão de oxigênio. Em ambos os casos, a vasculogênese e a eritropoese parecem acontecer no momento em que estes dois tecidos encontram-se em estado de maior hipóxia. Ao mesmo tempo, a abertura do vaso recém-formado e estabelecimento da circulação sanguínea, aumenta a disponibilidade de oxigênio o que poderia ser o estímulo para a diferenciação do endotélio hemogênico em células hematopoéticas definitivas, o que pode ser válido não só para o saco vitelínico e placenta, mas também para os grandes vasos produtores de CTH. O papel do saco vitelínico na hematopoese definitiva ainda é bastante controverso. Novos estudos revelaram que algumas células produzidas no saco vitelínico não só persistem no organismo adulto como também desempenham funções importantes para a homeostase pós natal (Ginhoux & Guilliams, 2016). Já se sabe que tanto o saco vitelínico quanto a placenta possuem potencial hematopoético intrínseco mas são os sinais do microambiente que determinam a especificação final desse potencial (Ciau-Uitza et al, 2014; Mikkola & Orkin, 2006). Ensaios adicionais serão

necessários para testar nossa hipótese bem como para revelar o potencial de reconstituição da hematopoese das células imunoblastoides da placenta.

5.2 Células Tpbpa⁺ derivadas do cone ectoplacentário como precursores do endotélio hemogênico e das células imunoblastoides na porção distal do labirinto

Uma vez identificada a formação *de novo* de vasos e células hematopoéticas na placenta, procuramos definir o precursor destas células a fim de compreender melhor o processo. Dois componentes mesodérmicos participam da formação da placenta corioalantoica, uma fina camada de mesotélio que compõe o córion e a alantoide essencialmente mesodérmica. Na formação das vilosidades do labirinto, a alantoide cresce e se liga ao mesotélio do córion por volta de 8,5 dg. A adesão entre essas duas estruturas ocorre pela ligação com Itga4, expressa no mesotélio do córion, com seu receptor VCAM1 presente na camada mesotelial da alantoide. A partir de então, o córion involui formando espaços que são preenchidos pelo mesoderma da alantoide contendo vasos fetais. As células trofoblásticas do córion se diferenciam nas CTG dos sinusoides maternos do labirinto e nas duas camadas de sinciciotrofoblasto, enquanto não há relatos na literatura até o momento sobre o destino do mesotélio do córion após a fusão com a alantoide (Simmons, 2014). A alantoide de aves, formada por mesoderma e endoderma, é capaz de produzir células hematopoéticas e endoteliais *in situ* (Caprioli et al, 1998; Caprioli et al, 2001). Em camundongos, estudos *in vitro* revelaram que tanto o córion quanto a alantoide têm potencial de formar colônias mieloeritroides e expressavam Runx1 antes da fusão (Corbel et al, 2007; Zeigler et al, 2006). Ao mesmo tempo, foi descrita a migração de angioblastos originados do mesoderma do saco vitelínico para estabelecer a vasculogênese *de novo* em alguns órgãos embrionários endodérmicos, como pulmões e fígado fetal (Drake, 2003). Somando ao fato de a placenta de camundongos possuir somente endoderma vestigial e próximo à porção fetal (Ogura et al, 1998), os vasos sanguíneos formados pelos angioblastos do saco vitelínico nestes trabalhos não possuem potencial hemogênico. Além disso, uma vez que acreditamos que a vasculogênese e a hematopoese ocorrem ao mesmo tempo na região distal do labirinto, imaginar que a formação dos focos hematopoéticos ocorra por processo de migração de uma célula mesenquimal com duplo-potencial envolveria a chegada de tais células por uma rota extravascular. Entretanto, não

encontramos nas placentas analisadas evidências morfológicas de célula mesenquimal ou endotelial extravascular, que deveria ter sido revelada pela positividade à vimentina, CD31, vWF ou c-Kit.

Experimentos na década de 1960 sugeriram a transformação de células trofoblásticas em células hematopoéticas. Os autores infundiram células da placenta de camundongos com 15 ou 18 dg em receptores irradiados, recém-nascidos timectomizados ou camundongos naturalmente anêmicos, e observaram a formação de nódulos esplênicos nestes animais contendo células de todas as linhagens sanguíneas. Para definir quais células eram responsáveis pela hematopoese no baço dos animais receptores, os autores infundiram células da placenta de camundongos com 18,5 dg, cujos fetos haviam sido removidos cirurgicamente aos 10,5 dg, e obtiveram resultados semelhantes. A histologia das placentas com 18,5 dg que tiveram os fetos removidos mostrou que elas eram compostas essencialmente por trofoblasto, o que levou os autores a sugerir a desdiferenciação de células trofoblásticas em hematopoéticas (Dancis et al, 1977; Dancis et al, 1968; Dancis et al, 1962). Apesar da possível contaminação de células pela corrente sanguínea, estes estudos foram pioneiros ao explorar a hematopoese na placenta e sugerir um precursor hematopoético trofoblástico e não-convencional.

A placenta é composta por uma variedade de células trofoblásticas. Estas consistem em células epiteliais derivadas do trofodermis e que expressam citoqueratina-8 em camundongos ou -7 na placenta humana (Simmons et al, 2008a). Curiosamente, as células hematopoéticas foram encontradas em contato íntimo com células trofoblásticas, às vezes sem endotélio visível entre elas. Células que expressam citoqueratina-8 também foram encontradas circulando nos vasos sanguíneos fetais com uma organização nuclear diferente das células trofoblásticas adjacentes. A análise com HE em nosso material mostrou células de natureza trofoblástica formando aglomerados de células com nucléolos salientes, semelhantes a células imunoblastoides. Algumas vezes, tais células pareciam perder a organização epitelial e adesão entre si, como se estivessem adquirindo um fenótipo migratório. Validando estes achados morfológicos, encontramos evidências de transição epitélio-mesenquimal em algumas células espongiotrofoblásticas.

Transição epitélio-mesenquimal é o nome dado ao processo no qual células epiteliais adquirem gradativamente um fenótipo mesenquimal. As células epiteliais

possuem moléculas de adesão intercelular, polaridade apical-basal e uma organização de citoesqueleto que as mantém imóveis e conectadas entre si. Por outro lado, as células mesenquimais possuem uma organização de citoesqueleto que lhes confere movimento (Kalluri & Weinberg, 2009). A transição epitélio mesenquimal é essencial para o desenvolvimento embrionário. Ela pode ocorrer também nos organismos adultos, nos processos fisiológicos de cicatrização, regeneração de tecidos e fibrose, bem como pode estar associada à progressão tumoral (Kalluri, 2009). Durante a transição, as células epiteliais passam por uma série de alterações bioquímicas que incluem a perda das junções intercelulares, polaridade e reorganização do citoesqueleto que envolvem a reprogramação gênica (Zeisberg & Neilson, 2009). Dependendo do processo biológico a que está relacionada, a transição epitélio mesenquimal pode exibir características genéticas e marcadores distintos. Em relação à transição epitélio-mesenquimal embrionária, é observada a diminuição de citoqueratina e o aumento de vimentina, entre outros marcadores que são atenuados ou adquiridos durante o processo (Zeisberg & Neilson, 2009).

As células espongiotrofoblásticas possuem menor intensidade de citoqueratina, o principal filamento intermediário das células epiteliais, do que as demais células trofoblásticas do labirinto e CTG-parietais na marcação por imunofluorescência. Além disso, alguns aglomerados de células espongiotrofoblásticas, identificadas pela presença da proteína Tpbpa, coexpressavam vimentina em diferentes intensidades, revelando a aquisição de um fenótipo mesenquimal. As células espongiotrofoblásticas em transição mesenquimal também expressavam o marcador endotelial CD31 na periferia celular. Muitas vezes, as células em transição mesenquimal estavam perto de vasos sanguíneos contendo células hematopoéticas imaturas sozinhas ou em *clusters*. Ainda, células trofoblásticas foram observadas em arranjos sugestivos de invaginações tubulares, os quais continham algumas células vimentina positivas, indicando uma possível reorganização de citoesqueleto similar ao processo de formação de lúmen durante a vasculogênese (Rai & Cross, 2014). A visualização destes arranjos foi possível devido ao escaneamento do corte histológico da placenta pelo microscópio confocal. Cortes mais espessos ou estudos de microscopia intravital com técnicas de óptica não-linear, como o multifóton por exemplo, seriam interessantes para avaliar melhor a estrutura tubular formada.

Mudanças de citoesqueleto em células trofoblásticas da placenta de camundongos foram sugeridas apenas indiretamente por experimentos *in vitro* (Parast et al, 2001; Rai & Cross, 2014; Rai & Cross, 2015). Nestes, as células tronco trofoblásticas de camundongos possuem capacidade intrínseca para formar estruturas tubulares semelhantes a vasos em culturas 3D de células (Rai & Cross, 2015). A habilidade de formar canais sanguíneos sem organização endotelial é conhecida como “mimetismo vasculogênico” e foi inicialmente descrita para explicar o comportamento de alguns tumores. Este termo foi adaptado para explicar a formação dos espaços de sangue materno pelas CTG na placenta, as quais que se originam a partir do córion ou do cone ectoplacentário. Fenômeno similar é realizado pelas CTG associadas às artérias espiraladas maternas, CTG-SpA, e é conhecido como “invasão vascular e mimetismo endotelial”. Nesse caso porém, não há morfogênese de tubo; as CTG-SpA, as quais se originam apenas a partir do cone ectoplacentário, invadem e substituem o endotélio de vasos maternos pré-existentes (artérias espiraladas maternas), adquirindo morfologia e propriedades semelhantes às células endoteliais (Rai & Cross, 2014). Sabe-se que as CTG de camundongos expressam numerosos fatores de crescimento e citocinas que são necessárias para a formação de vasos, incluindo VEGF, PGF e FGF. Entretanto, ainda são desconhecidos os mecanismos que regulam os processos de vasculogênese e mimetismo endotelial. Em nosso material, a presença de VEGF foi detectada em algumas células espongiotrofoblásticas, células trofoblásticas gigantes, e em algumas células trofoblásticas da região do labirinto incluindo células sanguíneas no interior dos vasos fetais.

O processo de transição epitélio-mesenquimal, entretanto, tem sido bastante explorado na placenta humana, principalmente devido a possíveis implicações em patologias gestacionais (Davies et al, 2016). Na placenta humana, as células citotrofoblásticas extravilosas (CTE) são responsáveis pelo remodelamento das artérias espiraladas maternas possuindo funções análogas às CTG de camundongos no processo de decidualização. Uma análise sistemática das células trofoblásticas vilosas e as CTE revelou que estas últimas passam por um processo de transição epitélio-mesenquimal para adquirir o fenótipo invasivo necessário à invasão arterial. Foi identificada uma série de fatores de transcrição envolvidos na aquisição do fenótipo mais invasivo destas células incluindo a aquisição de vimentina e CD31, que também demonstramos na placenta murina, e de VE-

caderina, que está presente na maioria dos endotélios hemogênicos. Curiosamente, a expressão de citoqueratina-7, o filamento intermediário das células trofoblásticas humanas, não é alterado. Por isso, o processo de transição epitélio-mesenquimal das CTE foi considerado parcial e continua sendo caracterizado. Foi observado ainda que a aquisição do fenótipo mesenquimal nas células trofoblásticas humanas é reduzido em certas patologias como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino (Davies et al, 2016; Fisher, 2015).

Em nosso material, observamos pela primeira vez *in situ* a transição epitélio-mesenquimal de células da zona de junção de camundongos na metade da gestação, as quais são originadas a partir do cone ectoplacentário. Começando em 9,5 dg, as células espongiotrofoblásticas coexpressaram as proteínas Tpbpa e vimentina em diferentes proporções de intensidades, além de CD31 na periferia. Aos 10,5 dg, as células duplo-positivas para Tpbpa e vimentina foram mais frequentes na zona de junção, com algumas células no labirinto e raras células na decídua. Embora algumas elas possam estar se diferenciando em CTG, realizando mimetismo vasculogênico ao redor do sangue materno, nós acreditamos que também possa estar ocorrendo a formação vascular e possivelmente hematopoese fetal. Algumas células em transição observadas em arranjos sugestivos de diferenciação vascular, estavam muitas vezes próximas a vasos contendo células hematopoéticas vimentina⁺, as quais possivelmente compartilham a mesma origem. É importante ressaltar que algumas células endoteliais dos vasos do labirinto não têm a morfologia fusiforme típica da maioria dos endotélios, o que foi evidenciado pela positividade do endotélio à vimentina e também previamente pelo nosso grupo pela marcação com Sca1 (Portilho et al, 2016). Sendo assim, sugerimos que células Tpbpa⁺ do espongiotrofoblasto poderiam ser precursores de, pelo menos, uma parte das células hematopoéticas formadas na placenta, em um mecanismo ainda não descrito de transição epitélio-mesenquimal-hematopoética.

A ocorrência de vasculogênese na porção distal das vilosidades sem eritropoese foi descrita em placentas humanas (Aplin et al, 2015). Uma vez que eventos de vasculogênese e hematopoese tendem a ser conservados entre as espécies, pode ser que ocorra vasculogênese isolada também em camundongos. Observamos células espongiotrofoblásticas expressando vimentina aos 12,5 dg, mas não aos 14,5 dg. Sendo assim, a vasculogênese sem hematopoese a partir do espongiotrofoblasto poderia ocorrer até 12,5 dg, possivelmente até 13,5 dg (idade

não analisada neste trabalho). A falta de evidências morfológicas pode ser justificada devido à ocorrência de eventos de forma muito mais rápida em camundongos, proporcional ao período de desenvolvimento embrionário de cada espécie.

Para testar nossa hipótese, realizamos experimentos de enxerto heterólogo subcapsular renal a partir do cone ectoplacentário. Os cones ectoplacentários foram coletados de camundongos com background GFP aos 7,5 dg e implantados sob a cápsula renal de camundongos imunocomprometidos fêmeas grávidas, buscando, assim, criar um ambiente o mais fidedigno possível para o desenvolvimento do enxerto ao manter hormônios da gestação para possíveis eventos hormônio-dependentes. A presença de GFP nas células do cone ectoplacentário permitiu identificá-las no tecido do animal receptor utilizando anticorpo anti-GFP. Foi demonstrado que o uso de anticorpo detecta de forma bastante sensível e específica as células GFP⁺, uma vez que a intensidade da proteína fluorescente decai bastante durante os processos de fixação e/ou processamento dos tecidos (Brazelton & Blau, 2005).

Três dias após o procedimento (correspondente a 10,5 dg), os quatro enxertos analisados apresentaram características histológicas similares, entre elas, a formação de células gigantes positivas para citoqueratina-8 e Tpbpa, que continham numerosas inclusões citoplasmáticas. Células menores do doador foram localizadas principalmente nas bordas do enxerto e foram identificadas com o anticorpo anti-GFP. Algumas células do enxerto emitiram prolongamentos citoplasmáticos entre si formando canais ao redor de áreas hemorrágicas, confirmando a habilidade de CTG em formar estruturas tubulares contendo sangue. Estas e algumas outras células derivadas do enxerto expressaram as moléculas vimentina e CD31. Foram observadas também, plaquetas vWF⁺ aderidas às projeções das células que formavam os canais sanguíneos. Estes dados confirmam a habilidade intrínseca das células do cone ectoplacentário em adquirir fenótipo mesenquimal e exibir características de células endoteliais, como a expressão de molécula de adesão de células endoteliais CD31 e propriedades anti-coagulantes. Além disso, embora raras, algumas células globosas do enxerto expressaram o marcador Runx1. A presença de Runx1, um fator de transcrição expresso em todas as células mesenquimais de tecidos hematopoéticos, endotélio hemogênico e CTH da linhagem definitiva (North et al, 2002), sugere que as células do cone

ectoplacentário possuem potencial hematopoético intrínseco. Em conjunto, os dados obtidos confirmam a capacidade intrínseca do cone ectoplacentário para formar canais de células mesenquimais e com perfil endotelial, e também em se diferenciar em células hematopoiéticas Runx1⁺ antes da fusão com os outros tecidos placentários.

5.3 Influência de PGF na vasculogênese e hematopoese na placenta

O PGF foi o segundo membro da família VEGF descrito e sua expressão foi encontrada inicialmente na placenta humana, fato que deu origem ao seu nome (Maglione et al, 1991). Em humanos existem quatro isoformas do gene PGF, enquanto camundongos têm apenas uma que corresponde ao PGF-2 de humanos (Dewerchin & Carmeliet, 2012). O PGF é um fator angiogênico importante durante o desenvolvimento e em várias situações patológicas, como cicatrização e alguns tumores (Falco, 2012; Torry et al, 2003). Por outro lado, em adultos saudáveis o PGF é expresso em baixas concentrações em apenas alguns órgãos, como coração, pulmão, tireoide, músculo esquelético e tecido adiposo (Falco, 2012). O PGF é capaz de se ligar nos receptores VEGFR1, solúvel ou ligado à membrana plasmática das células, ou aos receptores de neuropilina. Apesar de estudos recentes sugerirem que o PGF tem ação angiogênica direta, a teoria mais aceita é de que ele estimula a angiogênese de forma indireta ao se ligar ao receptor VEGFR1. Com isso, o VEGF fica livre para se ligar ao receptor VEGFR2, o que leva a uma resposta angiogênica mais intensa (Carmeliet et al, 2001; Dewerchin & Carmeliet, 2012).

Na placenta humana, o PGF é expresso no trofoblasto extraviloso, nas células citotrofoblásticas, sinciciotrofoblasto e mesênquima das vilosidades coriônicas (Tayade et al, 2007). O PGF também foi encontrado nas células endoteliais das veias umbilicais, uNK, células eritroblásticas entre outras células (Falco, 2012). Diferente do VEGF, cuja expressão é mais intensa no início da gestação e depois diminui, a expressão de PGF aumenta progressivamente da metade da gestação até a termo (Kaufmann et al, 2004). Durante a gestação, o PGF influencia a vasculogênese e angiogênese nas vilosidades, a decidualização e crescimento e sobrevivência das células trofoblásticas (Torry et al, 2003). O predomínio de VEGF no primeiro trimestre pode ser observado no padrão de angiogênese nas vilosidades

coriônicas desse período, nas quais observa-se a formação de uma rede capilar altamente ramificada, enquanto o predomínio de PGF nos demais períodos provoca o crescimento do capilar por alongamento. Acredita-se que tais diferenças de secreção de fatores e morfogênese possam estar relacionadas à pressão parcial do oxigênio (Kaufmann et al, 2004). Em humanos, baixas concentrações de PGF estão relacionadas à pré-eclâmpsia (Krauss et al, 2004).

Em camundongos, o PGF também é expresso por células trofoblásticas e deciduais desde o início da placentação, com pico entre 10 e 14 dg (Aasa et al, 2015). Apesar da importância do PGF para o crescimento, diferenciação e migração endotelial e trofoblástica, este fator foi considerado redundante durante a gestação por não comprometer o desenvolvimento normal de camundongos *knockout* para esse fator (Carmeliet et al, 2001). Esses camundongos mutantes nascem em frequência mendeliana, são saudáveis e férteis (Carmeliet et al, 2001), mas estudos recentes vêm mostrando que a função do PGF não é redundante em alguns aspectos importantes durante o desenvolvimento. Por exemplo, a ausência de PGF durante o desenvolvimento altera a formação vascular do cérebro (Luna et al, 2016). Na placenta, a ausência de PGF afeta a maturação das células uNK, causa pequenos atrasos no remodelamento das artérias espiraladas e alterações no padrão de ramificações angiogênicas na decídua assim como algumas alterações nos vasos linfáticos do útero materno, ao passo que a invasão trofoblástica não é prejudicada até 9,5 dg (Ratsep et al, 2014; Tayade et al, 2007).

O PGF é uma molécula que estimula a angiogênese por diversos mecanismos quando ligada ao receptor VEGFR1, expresso em muitos tipos de células incluindo as CTH. Nesse sentido, o PGF possui outras funções além da angiogênese como o recrutamento e maturação de progenitores da medula óssea para a reconstituição na hematopoese em camundongos adultos (Hattori et al, 2002; Rafii et al, 2003; Zhou et al, 2013). Uma vez que o PGF age no trofoblasto e células hematopoéticas e diante da perspectiva da formação de vasos sanguíneos e células hematopoéticas a partir de um precursor único da placenta, decidimos explorar a importância deste fator de crescimento nesse processo de diferenciação. Para isso, utilizamos camundongos *Pgf^{-/-}* com 10,5 dg. Apesar de observarmos pequenas alterações nos canais ou vasos maternos da decídua ou nas camadas de células trofoblásticas de algumas placentas, não realizamos nenhuma medição morfométrica devido à grande variação entre os sítios implantacionais. Em um dos

sítios, observamos algumas células em apoptose na região de labirinto, o que nos chamou atenção, visto que o PGF protege as células trofoblásticas da apoptose *in vitro* (Torry et al, 2003). Entretanto, uma vez que tal alteração foi observada em apenas uma placenta, não podemos descartar um problema circunstancial do sítio implantacional.

Na análise imunohistoquímica, os animais *Pgf*^{-/-} possuíam menor quantidade de células espongiotrofoblásticas, as quais pareciam expressar menos proteína Tpbpa. A transição epitélio-mesenquimal também se apresentou alterada, com menor expressão de vimentina observada na zona de junção e rara positividade ao CD31. Enquanto isso, o VEGF continuou sendo expresso intensamente nas células da placenta, principalmente nas CTG. Diversos estudos sugerem que o PGF regula o crescimento e diferenciação do trofoblasto, possivelmente por ação parácrina, já que tanto o PGF quanto o receptor VEGFR1 são expressos nas células trofoblásticas (Falco, 2012). Em humanos, a administração exógena de PGF estimulou *in vitro* a proliferação do trofoblasto extraviloso durante o primeiro trimestre da gestação (Athanassiades & Lala, 1998; Torry et al, 2003). Uma vez que as células trofoblásticas extravilosas realizam transição epitélio-mesenquimal e adquirem de fenótipo endotelial de forma similar às CTG da zona de junção, acreditamos que o PGF também possa regular a diferenciação das células trofoblásticas de camundongos de forma semelhante. O receptor VEGFR1 é abundante na camada espongiotrofoblástica aos 12,5 dg (Dumont et al, 1995). Sendo assim, o PGF pode ser necessário para uma eventual diferenciação das células espongiotrofoblásticas, e sua ausência poderia causar as alterações observadas na zona de junção dos camundongos *knockout*, incluindo a possível redução da transição epitélio-mesenquimal. Cabe acrescentar que camundongos que apresentam defeitos na formação do cone ectoplacentário e espongiotrofoblasto, possuem malformação do labirinto, o que, de certa forma, reforça a importância destas estruturas para vasculogênese e formação do labirinto (Soncin et al, 2015). Contudo, não há na literatura dados sobre a hematopoese inicial nestes animais.

Entretanto, nos surpreendeu o grande número de células hematopoéticas imaturas, frequentemente observadas em grupos de células homogêneos ou heterogêneos, cujas diferenças foram reveladas pelo tamanho, arranjo nuclear e intensidade de expressão ao CD41. A quantidade de células imaturas, positivas para

vimentina, CD41, assim como duplo positivas para CD41 e vimentina ou CD41 e vWF era superior ao dos animais B6, o que foi quantificado pela imunohistoquímica com o CD41. Ainda, alguns clusters próximos à zona de junção eram formados por células CD31 positivas, as quais ainda não haviam sido localizadas por nós nos vasos da placenta. Sendo assim, pode ser que o PGF influencie a transição epitélio-mesenquimal das células da zona de junção para formar as CTG dos canais de sangue materno, o que indiretamente poderia levar ao direcionamento para maior transição epitélio-mesenquimal-hematopoética e recrutamento de CTH de outros sítios hematopoéticos. Alternativamente ou simultaneamente, a expressão de outros fatores de crescimento pode estar aumentada para compensar a ausência de PGF, e estes fatores poderiam estimular também a expansão das células imaturas na placenta, originadas *in situ* e oriundas de outros sítios hematopoéticos. Por exemplo, acredita-se que ocorre o aumento da produção de VEGF na placenta dos camundongos *Pgf^{-/-}* (Carmeliet et al, 2001). Na ausência de PGF, o receptor VEGFR1, presente em células hematopoéticas e espongiotrofoblásticas, estaria disponível para se ligar com VEGF, o que aumentaria a sinalização VEGF/VEGFR1. Sabe-se que essa sinalização é importante para os processos de vasculogênese e hematopoese durante o desenvolvimento, o que poderia justificar o aumento de células hematopoéticas imaturas na placenta. O desvio da sinalização VEGF/VEGFR2 pode ser corrigido pelo aumento da produção de VEGF (Carmeliet et al, 2001).

Outros fatores poderiam estar envolvidos no aumento da hematopoese na placenta devido à ausência de PGF, uma vez que a placenta é um tecido rico em citocinas e fatores de crescimento. É importante ressaltar os mecanismos compensatórios que a placenta possui para manter o bem-estar da mãe e do feto ao longo da gestação. Assim, uma possível diminuição do suprimento sanguíneo devido à alterações nos vasos maternos na decídua (Ratsep et al, 2014) poderia estimular o aumento de células fetais na placenta, otimizando a captura de oxigênio. As células placentárias são as primeiras a perceberem alterações no curso normal da gestação, uma vez que a placenta é o órgão que estabelece a interface entre a mãe e o feto. Na placenta humana foi demonstrado o aumento na frequência e densidade das CTH nos vasos da placa coriônica durante processo inflamatório. Acredita-se que isso de alguma forma possa ajudar na sobrevivência do feto em um ambiente hostil (Ponder et al, 2016).

5.4 Existência de micronichos hematopoéticos na placenta

A potencial hematopoética da placenta foi sugerido na década de 1960, mas foi somente depois de 2003 que ela começou a ser explorada por alguns autores na tentativa de decifrar o seu papel na ontogenia do sistema hematopoético (Alvarez-Silva et al, 2003; Dancis et al, 1962). Foi sugerido por Rhodes e colaboradores que a placenta de camundongos produz CTPH de forma semelhante aos grandes vasos embrionários e que a expansão destas células tenderia a acontecer nos vasos menores do labirinto, evidenciado pelo grande número de células imaturas em mitose (células duplo-positivas Runx1⁺pH3S10⁺) (Rhodes et al, 2008). Ainda assim, pouco se sabe sobre os nichos celulares que suportam as HSC na placenta, ou os sinais envolvidos em sua maturação, expansão e mobilização.

Neste trabalho, encontramos indícios da ocorrência de hematopoese definitiva nos vasos maiores da placa coriônica e vasos do labirinto próximos a essa região. Muitos sinais importantes para a diferenciação das células hematopoéticas a partir de tecido mesodérmico são produzidos pelo endoderma visceral adjacente ao saco vitelínico e da porção ventral da aorta dorsal. Na placenta de camundongos, apenas a porção inicial do labirinto contém endoderma remanescente do saco vitelínico e ele poderia fornecer os sinais moleculares para a diferenciação da hematopoese definitiva nos vasos sanguíneos dessa região. Apesar de não termos realizado nenhum ensaio funcional para comprovar a natureza definitiva dos *clusters* celulares desta região, outras semelhanças morfológicas e fenotípicas sugerem que as células sejam formadas nessa região a partir de endotélio homogêneo similar aos grandes vasos.

Além dessa formação hematopoética “convencional”, encontramos indícios morfológicos de que os vasos da porção distal da placenta suportam a expansão, maturação e diferenciação das CTH, além de diferenciação eritroide e possível diferenciação vascular e hematopoética *de novo*. Uma característica reconhecida e compartilhada pelos sítios hematopoéticos embrionários é o desenvolvimento integrado dos sistemas vasculares e hematopoéticos. Nesse sentido, as células trofoblásticas da placenta produzem numerosas citocinas e moléculas de sinalização importantes não só pra o processo de vasculogênese e angiogênese mas também

para a biologia das CTH (Dzierzak & Robin, 2010; Mikkola & Orkin, 2006) e podem contribuir para os fenômenos observados. Diferentes concentrações de sinais e peculiaridades do endotélio no labirinto e na placa coriônica podem refletir as diferentes potencialidades de ambos os vasos. Além disso, a placenta em desenvolvimento cresce em um ambiente hipóxico (Kenchegowda et al, 2017) e acreditamos que esse seja o principal componente para a hematopoese observada na porção distal do labirinto.

O aumento do fornecimento de oxigênio na placenta ocorre após a maturação funcional da membrana placentária que acontece por volta do dia 11,5 em camundongos e no final do primeiro trimestre em humanos (Kenchegowda et al, 2017). Ainda que a placenta não esteja mais em hipóxia, o gradiente de oxigênio no labirinto se distribui de forma que o sangue menos oxigenado fica próximo da zona de junção (Adamson et al, 2002). A baixa tensão de oxigênio nos vasos dessa região pode estimular os diferentes aspectos hematopoéticos observados. Isso porque os tecidos placentários respondem de forma diferente às mudanças na tensão de oxigênio, o que reflete no repertório da sinalização molecular. Por exemplo o VEGF-A e a EPO são estimulados em condições de hipóxia, enquanto o mesmo não ocorre com o PGF (Kaufmann et al, 2004; Zhang et al, 2001). Considerando que tanto a expansão e maturação das CTH, quanto a diferenciação eritropoética, a vasculogênese e a hematopoese *de novo* acontecem na mesma janela curta do desenvolvimento e próximos à zona de junção, acreditamos que a tensão de oxigênio e diferentes sinais do microambiente regulem esses processos. Sendo assim, o labirinto próximo à zona de junção da placenta de camundongos pode conter diferentes nichos especializados para cada uma dessas funções, como ocorre na medula óssea dos organismos adultos (Wilson & Trumpp, 2006). Além disso, os capilares fetais ficam próximos à zona de junção e, sendo estes vasos de menor calibre, o sangue flui a uma velocidade mais baixa (Adamson et al, 2002), o que pode facilitar a hematopoese das células produzidas *in situ* e oriundas de outros sítios. Os mecanismos moleculares envolvidos em cada nicho e sua distribuição espaço-temporal merecem investigação.

Além do microambiente necessário para a hematopoese, a placenta possui uma posição estratégica para receber células de outros sítios hematopoéticos. Assim, ela pode receber temporariamente os progenitores do saco vitelínico e as CTH da aorta dorsal, vasos umbilicais e vitelínicos, modificando-os até o

amadurecimento do broto hepático (Gekas et al, 2005). A atividade hematopoética da placenta que observamos ocorre apenas entre 10,5 e 11,5 dg, concomitante com a migração de células para o fígado fetal. Apesar de alguns autores terem identificado o pico de células hematopoéticas na placenta entre 12,5 e 13,5 dg (Alvarez-Silva et al, 2003; Gekas et al, 2005; Ottersbach & Dzierzak, 2005), observamos nessa idade apenas células imaturas circulando sem organização em focos. O grande número de CTH observado por estes autores nos ensaios *in vitro* poderia estar relacionado ao aumento da placenta em tamanho, na qual mais células estariam presentes nos vasos sanguíneos, ou ainda refletir diferenças entre as linhagens de camundongos. Neste trabalho, camundongos SW apresentaram maiores variações morfológicas no grau de desenvolvimento das placentas de mesma idade gestacional, explicado pela maior variabilidade genética dessa linhagem. Apesar disso, as placentas de camundongos SW e B6 parecem ter morfologia semelhante na metade da gestação, com ocorrência de hematopoese em período similar do desenvolvimento.

5.5 Perfil molecular das populações de células hematopoéticas CD41⁺ da placenta

Apesar de alguns avanços para a caracterização fenotípica das CTH nos diferentes órgãos embrionários e em diferentes idades do desenvolvimento, múltiplos marcadores de superfície precisam ser combinados para fornecer um enriquecimento significativo de CTH. Ainda assim, diferentes progenitores coexistem com as CTH e compartilham alguns marcadores de superfície celular, dificultando a compreensão da evolução fenotípica de cada população celular. Além disso, existe uma certa dificuldade técnica na imunohistoquímica das células hematopoéticas em camundongos. Apesar de humanos e camundongos possuírem os mesmos sítios hematopoéticos embrionários, hierarquia de formação sanguínea semelhante e os mesmos fatores de transcrição regulando a hematopoese, os marcadores fenotípicos das CTH são bastante diferentes entre essas duas espécies (Mikkola, 2009; Mikkola & Orkin, 2006). É importante levar em consideração que nem sempre o processo de diferenciação envolve a alteração imediata das proteínas de superfície. É possível que as mudanças na expressão de RNAm ou na codificação

de proteínas específicas de determinada linhagem ocorram rapidamente e antes mesmo da divisão celular ou alteração no fenótipo da célula. O mesmo é válido para a degradação de RNAm do fenótipo celular antigo (Woolthuis & Park, 2016). Nesse sentido, identificar marcadores moleculares das CTPH pode fornecer pistas importantes sobre a identidade das células e seu programa de diferenciação, seus precursores e seu possível comprometimento celular em etapas subsequentes.

Nessa perspectiva, decidimos explorar o perfil de expressão gênica das células hematopoéticas imaturas da placenta, buscando evidências moleculares da sua origem embrionária, estágio de diferenciação e persistência pós-natal. Para o mapeamento molecular destas células hematopoéticas, buscamos uma metodologia que permitisse o enriquecimento dessa população rara de células dentro de um tecido complexo que é a placenta. A microdissecção a laser é uma ferramenta que permite o isolamento eficiente de populações celulares homogêneas dentro de cortes histológicos de tecidos mistos (Bidarimath et al, 2015). Essa técnica foi bastante útil neste trabalho para identificar genes cuja abundância de transcritos não seria grande em uma população mista de células, mas que poderiam fornecer pistas sobre o programa de diferenciação celular. Além disso, através da visualização das células, foi possível isolar e analisar separadamente pelo menos duas subpopulações de células imaturas baseada na sua morfologia ao microscópio.

Segundo a literatura, o CD41, é uma das primeiras proteínas de superfície celular adquirida pela linhagem hematopoética, sendo expressa fenotipicamente em todas as CTH e progenitores durante a metade da gestação (Kent et al, 2009). De fato, neste trabalho, o anticorpo anti-CD41 pareceu ser mais sensível para detectar as células hematopoéticas imaturas na placenta. Este anticorpo evidenciou os *clusters* de células da placa coriônica pela técnica de *whole mount* e também células isoladas ou em *clusters* no interior dos vasos fetais menores da placenta. Nas duplas-marcações, a proteína CD41 foi detectada em diferentes intensidades nas células imaturas, as quais coexpressavam o segundo marcador ou apenas o CD41; o inverso nunca foi observado. Sendo assim, o CD41 pareceu ser um anticorpo sensível e específico para a identificação das células no microscópio antes do seu isolamento para a microdissecção e expressão gênica. A expressão dos genes foi calculada utilizando o *Pgk1* como normalizador.

Primeiro, todas as células CD41⁺ encontradas na região de labirinto de camundongos com 10,5 dg foram microdissecadas. Duas amostras contendo células CD41⁺ totais foram analisadas. Apesar de todas estas células expressarem fenotipicamente CD41, elas constituem uma população heterogênea de células. Vimos nas análises morfológicas que estas células possuem diferentes tamanhos e arranjos nucleares, bem como diferentes afinidades aos anticorpos de marcadores hematopoéticos. Em conjunto, os dados morfológicos mostraram uma heterogeneidade de células hematopoéticas na placenta de camundongos aos 10,5 e 11,5 dg, consistente com uma provável expansão e maturação das CTH em diferentes progenitores. Além de receber CTH de diferentes órgãos, a placenta parece produzir uma parte das células *in situ*, através de dois mecanismos distintos e cujos precursores não parecem ser os mesmos. Próximo à placa coriônica, células hematopoéticas imaturas emergem como *clusters* de células homogêneas possivelmente a partir de endotélio hemogênico. As células formadas nessa região são morfológicamente semelhantes às CTH produzidas em outros sítios hematopoéticos, como a aorta dorsal, assim como algumas células menores que circulavam pelos vasos sanguíneos. Também encontramos evidências de expansão, maturação e eritropoese na porção distal da placenta, além da possível formação vascular e hematopoética *de novo*, possivelmente a partir de diferenciação epitélio-mesenquimal-hematopoética de células da zona de junção. Acreditamos que as células formadas nesta região poderiam ter dois destinos dependendo do estímulo: formar *clusters* de maturação/diferenciação nos vasos distais da placenta ou migrar para outro sítio embrionário, possivelmente o fígado fetal, aonde talvez contribuiriam para a hematopoese definitiva. Na tentativa de elucidar algumas dessas questões, as células CD41⁺ foram separadas durante a microdissecção em duas subpopulações de tamanhos diferentes antes da análise da expressão gênica.

A população denominada *single cell* (9SC) possivelmente engloba a maioria das células pequenas que na análise morfológica expressaram fenotipicamente c-Kit, CD41, Runx1, vWF e vimentina. Assim como observado anteriormente, estas células foram microdissecadas em toda extensão do labirinto, embora fossem mais frequentes próximas da placa coriônica. A população denominada *cluster* (8C) foi mais heterogênea, na qual foram capturadas células grandes, mas de diferentes formatos e arranjos nucleares. Elas geralmente estavam próximas a outras células, e foram mais frequentes próximas à zona de junção. Acreditamos que esta população

contém algumas das células formadas *in situ* e também as células que formavam *clusters* de células homogêneas e heterogêneas. A pequena quantidade de RNA obtida foi uma limitação da técnica superada pela pré-amplificação das amostras. Entretanto, o tempo foi um fator limitante para a microdissecção das duas subpopulações de células do mesmo sítio implantacional, sem que o RNA de uma delas fosse deteriorado. Sendo assim, o perfil comparativo entre as duas subpopulações foi feito entre placentas de fêmeas diferentes. Em contrapartida, essa tecnologia é a mais confiável para estudar a expressão gênica em uma população celular pequena sem contaminação das células do microambiente ao redor. Neste trabalho nós analisamos duas amostras de células CD41⁺ *totais* da região do labirinto, uma amostra de células grandes (8C) e uma amostra de células menores (9SC).

Neste trabalho, foram testados 40 genes-alvo cuja expressão foi calculada utilizando o *Pgk1* como normalizador. Dois normalizadores foram escolhidos por serem estáveis em tecidos embrionários com base na literatura (Veazey & Golding, 2011), enquanto o *Gapdh* foi escolhido por ser bastante utilizado para esse fim, incluindo em trabalhos de expressão gênica em tecido placentário. Entretanto, apesar de transcritos do *Gapdh* terem sido detectados na placenta inteira, eles não foram detectados nas amostras microdissecadas. Em um artigo recém-publicado, a expressão temporal e espacial de *Gapdh* foi analisada na placenta de camundongos. Apesar de ser uma enzima importante para a glicólise e ser considerada ubiquamente expressa nas células, os autores mostraram que a localização e expressão dessa enzima varia entre as células trofoblásticas da placenta ao longo da gestação, sugerindo cautela na escolha deste gene como referência endógena para a placenta (Min et al, 2017).

Todas as amostras analisadas continham células que expressavam a proteína CD41, mas apenas a amostra 9SC apresentou transcritos de *CD41*. O CD41 é a primeira molécula a ser expressa fenotipicamente nas células hematopoéticas quando elas emergem do endotélio hemogênico ou de precursores mesodérmicos do saco vitelínico (Bertrand et al, 2005; Kent et al, 2009; Mikkola et al, 2003; Mikkola & Orkin, 2006). Entretanto, essa molécula vai sendo perdida pelas CTH ao longo do desenvolvimento o que justifica a presença da proteína na superfície das células e a ausência de RNAm. Até mesmo na placenta inteira, sem microdissecção, a detecção molecular de *CD41* foi baixa. A presença de transcritos

de *CD41* apenas na amostra de 9SC, ainda que em baixa quantidade relativa, corrobora que essa subpopulação possui um fenótipo mais imaturo. De fato, nas nossas análises de imunofluorescência, o CD41 foi expresso mais intensamente nas células menores quando perto de *clusters* de células maiores. Enquanto transcritos de *CD41* foram detectados apenas na amostra 9SC, os de *vWF* foram detectados apenas na amostra 8C. Sendo assim, nos parece que a aquisição de *vWF* é secundária ao CD41 e adquirida ao longo do desenvolvimento das células hematopoéticas. Na imunofluorescência, foi observada uma célula imatura pequena expressando fenotipicamente CD41 e aderida a outras duas células maiores que coexpressavam CD41 e *vWF* em diferentes intensidades. Isso corrobora a hipótese de que as células imaturas menores, oriundas da placenta ou outros sítios hematopoéticos e que expressam fenotipicamente CD41, sofrem expansão e maturação na placenta e que o *vWF* é um dos marcadores moleculares adquiridos durante a maturação.

A natureza imatura das células CD41 microdissecadas foi comprovada pela expressão gênica de outros marcadores hematopoéticos comumente expressos nas CTH encontradas da AGM e fígado fetal como o *Runx1*, *AA4.1*, *VE-caderina*, *Sca1* e o *CD31* (Bertrand et al, 2005; Boisset et al, 2010; Mikkola & Orkin, 2006; Taoudi et al, 2005; Yokomizo & Dzierzak, 2010). Além destes genes serem comumente expressos nas CTPH, alguns deles são expressos também no endotélio hemogênico (Mikkola & Orkin, 2006; Petrenko et al, 1999; Taoudi et al, 2005), indicando que pelo menos uma parte das células microdissecadas pode ter origem a partir desses precursores endoteliais. Dentre estes genes, o *Runx1* nos chamou atenção pela abundância de transcritos em todas as amostras analisadas enquanto na placenta total ele é pouco expresso. Isso mostrou que a maior parte das células que expressam *Runx1* também expressa CD41. Uma vez que todas as células tronco e progenitores hematopoéticos da linhagem definitiva expressam fenotipicamente *Runx1* durante a vida embrionária (North et al, 2002), a presença desse gene nas células CD41⁺ que circulam e expandem na placenta sugere que a maioria destas células potencialmente persiste na vida pós-natal. A expressão relativa de *Runx1* foi maior na amostra 9SC, a qual acreditamos que seja uma população mais homogênea. Entretanto, essa população também apresentou maior quantidade de transcritos de *VE-caderina* e *Cd31*, sendo esse último ausente na amostra 8C.

Sendo assim, é possível que a amostra 8C contenha tipos celulares de origens diferentes ou células em processo de maturação e/ou diferenciação.

Consistente com a maturação e/ou diferenciação das células, transcritos de *Vimentina* estavam presentes na amostra 9SC, mas ausentes em 8C. Na análise histológica, observamos diferentes padrões de expressão da vimentina em células de diferentes morfologias. Nas células organizadas em *clusters* com outras células imaturas vimos que a expressão fenotípica da vimentina podia ser menos intensa ou até ausente em pelo menos uma das células. Quando o anticorpo anti-vimentina foi combinado com o anticorpo anti-CD41, as células que exibiram dupla-marcação tinham menor quantidade de filamentos de vimentina enquanto algumas células expressaram apenas a molécula CD41. Em conjunto, esses dados reforçam que a população 9SC tem fenótipo mais imaturo e que a população 8C contém células em diferenciação. Por outro lado, algumas células próximas à zona de junção e células que brotavam da parede vascular como células únicas pareciam expressar grande quantidade de vimentina. Pode ser que tais células não expressem fenotipicamente CD41 e, por isso, essa população não tenha sido identificada. Alternativamente, a quantidade de transcritos de vimentina que era para ser apenas vestigial, não foi detectada por se tratar de células raras dentro da população heterogênea de 8C.

Ainda que ocorra diferenciação das células hematopoéticas CD41⁺, a ausência dos transcritos dos genes *PU.1* e *Cd45* sugere que estas células mantêm um fenótipo imaturo. O PU.1 é importante para a autorrenovação das CTH do fígado fetal e sua expressão aumenta durante a diferenciação da linhagem mieloide (Back et al, 2005). Foi descrito que as CTH não expressam a proteína pan-hematopoética CD45, a qual é adquirida ao longo do desenvolvimento começando a aparecer nas células a partir de 11,5 dg (Mikkola & Orkin, 2006). De fato, a aquisição de CD45 foi relacionada com a ausência de CD41 (McKinney-Freeman et al, 2009) o que justifica sua ausência nas células microdissecadas. O *Sca1* também representa um gene cuja expressão aparece um pouco mais tarde no desenvolvimento, mais ou menos junto com o *CD45* (Mikkola & Orkin, 2006) e persiste durante a vida adulta. Transcritos de *Sca1* foram identificados em todas as amostras microdissecadas exceto em 8C, enquanto a placenta inteira, sem microdissecção, possuiu grandes quantidades desse transcrito. A aquisição de *Sca1* é secundária à de CD41 e justificaria a presença de poucos transcritos na maior parte das amostras microdissecadas em comparação com células coletadas de toda a placenta, uma

vez que seria necessário perder a expressão de CD41 para expressar Sca1. Nesse sentido, identificamos por imunofluorescência a expressão fenotípica de Sca1 em células imunoblastoides que formavam *clusters* heterogêneos próximos à zona de junção em camundongos Swiss Webster aos 10,5 dg (Portilho et al, 2016). Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de existirem células ainda bastante imaturas na subpopulação 8C. Isso é reforçado pela ausência de transcritos de *Sca1* na população 8C, a qual deveria ter maior quantidade do transcrito se possuísse apenas células em diferenciação.

Inesperadamente, não observamos transcritos detectáveis de *c-Kit* nas células imaturas microdissecadas, enquanto a placenta inteira exibiu transcritos desse gene. O c-Kit é o receptor do fator de SCF e é descrito como um dos primeiros marcadores expressos fenotipicamente em todas as células tronco e progenitores hematopoéticos, fetais e adultas (McKinney-Freeman et al, 2009). Apesar disso, nem todas as células expressaram fenotipicamente c-Kit durante as nossas análises por imunofluorescência e nós sugerimos que estas células tenham origem diferente, adquirindo c-Kit secundariamente ao CD41; ou que o gene para c-Kit expresso durante o brotamento é, em seguida, regulado negativamente nessa etapa do desenvolvimento, e depois produzido novamente.

Além de genes comumente encontrados nas células tronco e progenitores hematopoéticos, alguns genes relacionados à diferenciação da linhagem eritroide também foram detectados na análise molecular. O CD9 é uma molécula é expressa em diversas células incluindo células mieloides e do estroma hematopoético, mas sua expressão fenotípica nas células eritroides dessa fase do desenvolvimento foi encontrada apenas na linhagem eritroide primitiva (Fraser, 2013). O Myb, por sua vez é um fator de crescimento relacionado ao desenvolvimento hematopoético, mas camundongos *knockout* para esse gene não têm a eritropoese primitiva alterada, sugerindo influência apenas na linhagem eritroide definitiva (Fraser, 2013; Soza-Ried et al, 2010). Transcritos de ambos os genes estavam presentes em todas as amostras microdissecadas. Entretanto, a maior expressão de *Cd9* associada à presença de transcritos das hemoglobinas embrionárias sugere que pelo menos algumas das células imaturas CD41⁺ microdissecadas estão comprometidas com a diferenciação eritroide primitiva. A quantidade de transcritos para as hemoglobinas e *Cd9* foi maior na subpopulação 9SC. Curiosamente, essa população celular possuiu grande quantidade de transcritos de globina presente em eritrócitos tardios e

definitivos. Ela também foi a subpopulação que expressou maior quantidade de *Runx1* e outros marcadores de células hematopoéticas definitivas. Sendo assim, acreditamos que é possível que essas células sejam comprometidas com a eritropoese definitiva, a qual terá fase futura importante de enucleação no fígado fetal.

A proteína eritropoetina age através do seu receptor, o EpoR, induzindo a maturação dos eritrócitos definitivos. Uma vez que detectamos a proteína Epo em algumas células trofoblásticas da placenta e focos eritropoéticos, procuramos identificar se as células hematopoéticas microdissecadas poderiam responder ao estímulo. Entretanto, apesar dos transcritos de *Epo* terem sido detectados nas células microdissecadas, transcritos do seu receptor não estavam presentes. Outras funções da Epo incluem a proteção tecidual devido a ação antioxidante e antiapoptótica, ação anti-hemorrágica ao acelerar a maturação de megacariócitos para a produção de plaquetas em sinergia com a trombopoietina e também estimula a angiogênese. Sendo assim, a Epo estaria sendo produzida e secretada pelas células CD41⁺ para induzir respostas em outras células que expressem EpoR. Alternativamente, a Epo seria traduzida apenas em etapas tardias uma vez que não observamos expressão fenotípica da proteína na análise por imunofluorescência. O que nos parece correto, entretanto, é que a ausência do receptor de Epo provavelmente é um mecanismo de proteção das células imaturas para evitar um comprometimento eritroide precoce. A presença de hemoglobinas, por outro lado, sugere que pelo menos algumas destas células estão comprometidas com a linhagem eritroide. Sendo assim, a aquisição do receptor de Epo seria secundária e adquirida durante as etapas da diferenciação, quando estas células perdem a expressão fenotípica de CD41.

As únicas células que produzem hemoglobina são as células da linhagem eritroide. A presença de transcritos de hemoglobina nas células microdissecadas sugere que algumas destas células possuem comprometimento com essa linhagem. A presença de hemoglobinas embrionárias e adultas sugere que células CD41⁺ das linhagens primitiva e definitiva poderiam circular ao mesmo tempo nos vasos placentários. A maior expressão relativa na subpopulação 9SC pode sugerir também que durante a eritropoese ocorre a produção simultânea das cadeias embrionárias e adultas, e que fatores do microambiente aonde estas células circulam (provavelmente tensão de oxigênio) determinam qual fenótipo que irá se manifestar.

Escolhemos o gene *CD71* no contexto da eritropoese, uma vez que sua proteína é expressa em altas concentrações nos eritroblastos primitivos e definitivos onde tem papel fundamental na maturação da linhagem eritroide (Fraser et al, 2007). O *CD71* é o receptor da transferrina sendo formado por uma glicoproteína de membrana importante para a absorção indireta do ferro ligado à proteína transferrina (Marsee et al, 2010). A presença de transcritos de *CD71* nas células microdissecadas, em conjunto com outros genes comumente expressos em células da linhagem eritroide, reforça a hipótese de que algumas das células *CD41+* microdissecadas estejam comprometidas com a linhagem eritroide. Ao mesmo tempo, o ferro é essencial para a proliferação celular pois participa da cadeia de transferência de elétrons nas mitocôndrias e atua no sítio ativo de diversas proteínas e enzimas, incluindo cofatores da biossíntese de DNA (Pourcelot et al, 2015). Sendo assim, a presença de transcritos de *CD71* em células que também possuem expressão de genes da linhagem hematopoética imatura, pode indicar ainda células imaturas com alto índice proliferativo (Chao et al, 2015). Em combinação com outros anticorpos de células hematopoéticas, o *CD71* já foi utilizado para identificar progenitores hematopoéticos na medula óssea e em corpos embrionários em cultura (Chao et al, 2015; Gross et al, 1997). As células hematopoéticas devem, portanto, ajustar a quantidade de ferro requerido e cada estágio do desenvolvimento, seja para a proliferação/ autorrenovação das células tronco ou para diferenciação completa da linhagem eritroide (Pourcelot et al, 2015).

Apesar de estar presente em vários tipos celulares, foi observado que o *CD71* é expresso em maior quantidade nos precursores eritroides, aonde são importantes para a síntese de hemoglobinas, e também no sinciciotrofoblasto da placenta, aonde tem papel importante na transferência de ferro para o feto (Cao & Fleming, 2016). Na placenta humana, o *CD71* e a transferrina foram localizados no citotrofoblasto, macrófagos, endotélio fetal, mas principalmente no sinciciotrofoblasto. Em camundongos, a molécula de *CD71* foi localizada nas membranas do labirinto e em algumas células endoteliais (Bastin et al, 2006; Cao & Fleming, 2016). Em nosso material, detectamos a molécula *CD71* por imunofluorescência também no espongiotrofoblasto, embora de forma menos intensa que na membrana placentária do labirinto e nas células eritroides circulantes. A detecção de transcritos de *CD71* nas células *CD41+* microdissecadas em combinação com outros genes específicos do cone ectoplacentário/espongiotrofoblasto também sugere uma origem

embrionária comum a essas populações celulares. Enquanto algumas células espongiotrofoblásticas de camundongos B6 expressaram CD71, o mesmo não ocorreu em camundongos *Pgf^{-/-}*. Nesse sentido, é possível que a ausência de PGF influencie negativamente a eritropoese placentária, favorecendo a manutenção do estado indiferenciado das células tronco e progenitores hematopoéticos da placenta.

Assim como o *CD71*, transcritos de *Cd9* são expressos em diferentes tipos celulares incluindo eritroblastos como previamente mencionado. O produto de *Cd9* é uma proteína de membrana que pode estar associada a uma série de outras proteínas como integrinas, imunoglobulinas ou fatores de crescimento e acredita-se que elas facilitem o agrupamento de complexos proteicos, aumentando a estabilidade deles. Com isso elas podem atuar em diferentes processos biológicos, embora ainda não se sabe seu papel nas células da placenta. Essa proteína está presente nas células do trofoblasto extraviloso na placenta humana (Hirano et al, 1999). Em camundongos, anticorpos detectaram a presença de CD9 nas células decíduais, CTG, espongiotrofoblasto e labirinto (Wynne et al, 2006). Assim como o *CD71*, a presença de transcritos de *Cd9* pode indicar, além do comprometimento com a linhagem eritroide, uma provável origem de algumas células CD41⁺ microdissecadas a partir de células trofoblásticas.

Na imunofluorescência, observamos a transição epitélio-mesenquimal das células do espongiotrofoblasto através da coexpressão da proteína *Tpbpa* com as moléculas vimentina e CD31. Diversos arranjos morfológicos na placenta de camundongos aos 10,5 e 11,5 dg e experimentos de enxerto do cone ectoplacentário também nos fizeram imaginar a presença de precursores no espongiotrofoblasto que realizariam uma transição epitélio-mesenquimal-hematopoética, formando eritrócitos e vasos sanguíneos *de novo* na porção distal da placenta, cujas células endoteliais teriam potencial hemogênico. De fato, observamos a presença de transcritos de *citoqueratina-8*, *Vimentina* e *Cd31* nas células hematopoéticas microdissecadas. Embora não seja usual a presença de citoqueratina em células mesenquimais e hematopoéticas, a transição epitélio-mesenquimal das células trofoblásticas extravilosas da placenta humana não envolve a diminuição da expressão de citoqueratina (Davies et al, 2016). Em nosso material, observamos raras células no interior da circulação fetal expressando citoqueratina-8. Entretanto, nos parece que diferente da placenta humana, a transição epitélio-mesenquimal-hematopoética das células trofoblásticas em

camundongos envolve, de fato, alterações na expressão de citoqueratina, como foi observado na imunofluorescência e na baixa expressão relativa de *citoqueratina-8* em relação aos marcadores mesodérmicos e endoteliais, como *Vimentina*, *VE-caderina* e *Cd31*. Esses dados sugerem uma expressão vestigial de *citoqueratina-8* e, talvez, um estágio de endotélio hemogênico antes da diferenciação hematopoética.

Outros transcritos de células trofoblásticas foram detectados nas células CD41⁺ microdissecadas, incluindo os marcadores de células tronco trofoblásticas *Cdx2* e *Esrrb* (Cross, 2005; Gasperowicz & Natale, 2011; Latos et al, 2015). Fora da placenta, o *Cdx2* também é expresso no saco vitelínico aos 7,5 dg aonde influencia a hematopoese primitiva e definitiva ao regular a expressão de fatores de transcrição hematopoéticos. Na ausência de *Cdx1* e *Cdx2*, os precursores mesodérmicos do saco vitelínico são especificados, mas não ocorre a diferenciação em eritroblastos hemoglobinizados, nem de vasos sanguíneos e ainda leva a uma diminuição na expressão de genes importantes para a hematopoese aos 9,5 dg.

As células microdissecadas também apresentaram transcritos de *Tpbpa* que são expressos exclusivamente por células do cone ectoplacentário e precursores presentes no espongiotrofoblasto (Rawn & Cross, 2008). A presença desse fator que é exclusivamente expresso na placenta de camundongos corrobora nossas análises morfológicas de que células presentes no cone ectoplacentário persistem na camada espongiotrofoblástica e dão origem a pelo menos uma parte das células hematopoéticas na placenta. Além disso, a expressão dos genes *Pcdh12* e *Aldh1a3* são descritos em algumas células do cone ectoplacentário e mais tarde nas células glicogênicas, mas não em células espongiotrofoblásticas, sugerindo um precursor hematopoético único definido ainda na fase de cone ectoplacentário e que permanece na zona de junção (Bouillot et al, 2006; Outhwaite et al, 2015).

As células hematopoéticas microdissecadas também expressam o gene *Gcm1*. A presença desse gene foi identificada por hibridização *in situ* em clusters de células imaturas no trofoblasto coriônico e mais tarde na camada de sinciciotrofoblasto-II. Acredita-se que o *Gcm1* seja importante para a iniciar as ramificações das vilosidades do labirinto (Walentin et al, 2016). É possível que esse gene seja importante para a formação vascular realizada pelas células progenitoras do espongiotrofoblasto na região distal da placenta. O gene *Gcm* foi identificado pela

primeira vez em células progenitoras do sistema nervoso de *Drosophila*, de onde originou seu nome (glial cells missing). Desde então, a expressão de *Gcm* em diferentes locais sugere que ele possa ter outras funções, como a diferenciação de hemócitos em *Drosophila* e morfogênese do labirinto na placenta de camundongos (Basyuk et al, 1999; Holz et al, 2003). Uma vez que a hematopoese em insetos e camundongos é bastante conservada em nível genético e funcional (Crozatier & Vincent, 2011; LihuiWang et al, 2014), a expressão de *Gcm1* na placenta também pode contribuir para a hematopoese local.

Nas análises morfológicas, as células que pareciam se diferenciar a partir de trofoblasto *in situ* eram grandes e imunoblastoides e, por isso, acreditamos que elas estariam contidas na amostra 8C. Entretanto, foi a subpopulação 9SC que apresentou maiores quantidades relativas de transcritos de células trofoblásticas, com exceção da *Citoqueratina-8* e *Aldh1a3*. De forma inesperada, a subpopulação 8C não apresentou transcritos detectáveis de *Tpbpa*, *Cdx2* ou *Vimentina*. Ainda que os dados morfológicos da placenta na metade da gestação e dos experimentos de enxerto sejam bem claros quanto ao fenótipo imunoblastoide do endotélio hemogênico e das células imaturas que são formadas *in situ*, não podemos excluir a possibilidade de estas células adotarem um fenótipo diferente uma vez que entrem na corrente sanguínea. Nesse sentido, as células derivadas do trofoblasto poderiam estar em ambas as subpopulações e alguns genes não foram detectados na amostra 8C por esta ser mais heterogênea. Sendo assim, é possível que longe dos estímulos proliferativos e eritropoéticos da região distal onde essas células são formadas, elas sejam capazes de manter o seu estado indiferenciado e migrar para outro local anatômico, possivelmente o fígado fetal, e contribuir para a hematopoese definitiva. Entretanto, ensaios funcionais fazem-se necessários para comprovar essa hipótese.

Outros genes expressos em células trofoblásticas foram detectados em baixa quantidade relativa e em apenas uma das quatro amostras analisadas. Sendo assim, acreditamos que seria necessário aumentar o *N* amostral para demonstrar a presença destes transcritos nas células CD41⁺ microdissecadas. Além da identificação de um conjunto de genes expressos nas células trofoblásticas, encontramos genes expressos no endotélio hemogênico, mas nenhum gene expresso nas células mesenquimais de tecidos hematopoéticos, da alantoide ou do córion, como *Flk1*, *Vcam1* e *Itga4* respectivamente. Apesar da possibilidade de as

células hematopoéticas terem perdido esses marcadores após a diferenciação hematopoética, acreditamos que pelo menos uma parte das células hematopoéticas da placenta sejam formadas por um estágio intermediário de endotélio hemogênico. Esse postulado está baseado não somente no perfil molecular, mas também nas análises morfológicas e na literatura (Ottersbach & Dzierzak, 2005; Rhodes et al, 2008).

A parte de análise gênica deste estudo é limitado às células hematopoéticas que expressam fenotipicamente CD41 e ao conjunto de genes escolhidos para o qPCR. Entretanto, o estudo integrado usando técnicas morfológicas, de enxerto *in vivo* e de análise molecular de células microdissecadas nos permitiu identificar uma nova população de células hematopoéticas que são formadas na placenta a partir de precursores trofoblásticos únicos e endotélio hemogênico.

6 CONCLUSÕES

1. A placenta de diferentes linhagens de camundongo apresenta atividade hematopoética nas idades gestacionais de 10,5 e 11,5 dg, expressa pela produção de células tronco hematopoéticas e diferenciação restrita à linhagem eritroide.

2. Células tronco hematopoéticas parecem ser formadas diretamente de progenitores localizados na placenta, através de mecanismos distintos que parecem ocorrer ao mesmo tempo em nichos diferentes dentro da região de labirinto, sendo um associado à placa coriônica e outro próximo à zona de junção.

3. No nicho hematopoético próximo à placa coriônica, algumas células endoteliais dos vasos mais largos do labirinto parecem se diferenciar em progenitores hematopoéticos de forma semelhante a hematopoese definitiva descrita na aorta dorsal e artérias umbilicais e vitelínicas.

4. No nicho hematopoético próximo à zona de junção, clusters de células imaturas heterogêneas sugerem ocorrência de expansão e diferenciação das células tronco e progenitores hematopoéticos na placenta, originados in situ ou oriundos de outro sítio hematopoético.

5. O Fator de von Willebrand (vWF) expresso por células hematopoéticas no topo da cadeia hierárquica é adquirido ainda na fase embrionária inicial e pré-fígado fetal.

6. Ainda na região distal da placenta murina ocorre a produção de eritrócitos nucleados e vasculogênese, vasos estes com potencial de endotélio hemogênico, como acontece no saco vitelínico.

7. Há transição epitélio-mesenquimal de células espongiotrofoblásticas da zona de junção envolvidas nos processos de vasculogênese e possivelmente também na hematopoese. Esse potencial está presente em progenitores Tpbpa⁺ do cone ectoplacentário em fase anterior à sua diferenciação em espongiotrofoblasto.

8. O fenótipo das células formadas pelo espongiotrofoblasto parece ser imunoblastoide, assim como o endotélio hemogênico precursor. Estas células podem expandir e/ou diferenciar no nicho placentário próximo à zona de junção e/ou podem migrar para outros sítios hematopoéticos embrionários.

9. Células CD41⁺ distribuídas ao longo do labirinto da placenta murina puderam ser subclassificadas em dois grupos, um deles de células mais isoladas e outro de células agrupadas e mais heterogêneas, grupos estes que apresentaram assinatura de expressão gênica diferente e consistente com as vias de diferenciação hematopoética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasa KL, Zavan B, Luna RL, Wong PG, Ventura NM, Tse MY, Carmeliet P, Adams MA, Pang SC, Croy BA (2015) Placental growth factor influences maternal cardiovascular adaptation to pregnancy in mice. *Biology of Reproduction* **92**
- Abramson S, Miller R, Phillips R (1977) The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* **145**: 1567-1579
- Adamo L, García-Cardena G (2012) The vascular origin of hematopoietic cells. *Developmental Biology* **326**: 1-10
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002) Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Developmental Biology* **250**: 358-373
- Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E (2000) Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes & Development* **14**: 3191-3203
- Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaün J, Dieterlen-Lièvre F (2003) Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* **130**: 5437-5444
- Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC (2000) The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nature Genetics* **25**
- Aplin JD, Whittaker H, Lim YTJ, Swietlik S, Jayne Charnock, Jones CJP (2015) Hemangioblastic foci in human first trimester placenta: Distribution and gestational profil. *Placenta*: 1-9
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh G, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**: 149-161
- Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T (2012) Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1266**: 72-77
- Athanassiades A, Lala P (1998) Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* **19**: 465-473
- Ayres-Silva JdP, Manso PPdA, Madeira MRdC, Pelajo-Machado M, Lenzi HL (2011) Sequential morphological characteristics of murine fetal liver hematopoietic microenvironment in Swiss Webster mice. *Cell Tissue Res* **344**: 455-469
- Babovic S, Eaves CJ (2014) Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells. *Experimental Cell Research* **329**: 185-191

- Back J, Allman D, Chan S, Kastner P (2005) Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Experimental Hematology* **33**: 395-402
- Bárcena A, Muench MO, Kapidzic M, Fisher SJ (2009) A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. *Reprod Sci* **16**: 178–187
- Bastin J, Drakesmith H, Rees M, Sargent I, Townsend A (2006) Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *British Journal of Haematology* **134**: 532–543
- Basyuk E, Cross JC, Corbin J, Nakayama H, Hunter P, Nait-Oumesmar B, Lazzarini RA (1999) Murine Gcm1 Gene Is Expressed in a Subset of Placental Trophoblast Cells. *Developmental Dynamics* **214**: 303-311
- Becker A, McCulloch E, Till J (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454
- Beerman I, Luis TC, Singbrant S, Celso CL, Méndez-Ferrer S (2017) The Evolving View of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Experimental Hematology*
- Benz C, Copley M, Kent D, Wohrer S, Cortes A, Aghaeepour N, Ma E, Mader H, Rowe K, Day C, Treloar D, Brinkman R, Eaves C (2012) Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* **10**: 273-283
- Berahovich RD, Zabel BA, Penfold MET, Lewén S, Wang Y, Miao Z, Gan L, Pereda J, Dias J, Slukvin II, McGrath KE, Jaen JC, Schall TJ (2010) CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *The Journal of Immunology* **185**: 5130–5139
- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine MI, Jalil A, Boucontet L, Godin I, Cumano A (2005) Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *PNAS* **102**: 134-139
- Bevilacqua E, Lorenzon AR, Bandeira CL, Hoshida MS (2014a) Biology of the Ectoplacental Cone. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, Croy AB, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL (eds). Elsevier
- Bevilacqua E, Lorenzon AR, Bandeira CL, Hoshida MS, Garbelini MCDL, Gonçalves CR (2014b) Ectoplacental Cone Isolation, Culture and Assessment. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, Croy A, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL (eds). Elsevier
- Bevilacqua E, Abrahamsohn PA (1988) Ultrastructure of Trophoblast Giant Cell Transformation During the Invasive Stage of Implantation of the Mouse Embryo *J Morphology* **198**: 341-351
- Bidarimath M, Edwards AK, Tayade C. (2015) Laser Capture Microdissection for Gene Expression Analysis. In Mor G, Alvero AB (eds.), *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York, New York, Vol. 1219.

- Boisset J-C, Cappellen Wv, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C (2010) In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* **464**: 116
- Bordignon C (2006) Stem-cell therapies for blood diseases. *Nature* **441**: 1100-1102
- Bos FL, Hawkins JS, Zovein AC (2015) Single-cell resolution of morphological changes in hemogenic endothelium. *Development* **142**: 2719-2724
- Bouillot S, Rampon C, Tillet E, Huber P (2006) Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta* **27**: 882-888
- Braga J, Marques R, Branco A, Gonçalves J, Lobato L, Pimentel JP, Flores MM, Gonçalves E, Jorge CS (1996) Maternal and perinatal implications of the use of human recombinant erythropoietin. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **75**: 449-453
- Brazelton TR, Blaua HM (2005) Optimizing Techniques for Tracking Transplanted Stem Cells In Vivo. *Stem Cells* **23**: 1251-1265
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**: 841-846
- Cañete A, Carmona R, Ariza L, Sánchez MJ, Rojas A, Muñoz-Chápuli R (2017) A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice. *Haematologica* **102**: 647-655
- Cao C, Fleming MD (2016) The placenta: the forgotten essential organ of iron transport. *Nutrition Reviews* **74**: 421-431
- Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lièvre F (1998) Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1641-1646
- Caprioli A, Minko K, C. Drevon, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F, Jaffredo T (2001) Hemangioblast Commitment in the Avian Allantois: Cellular and Molecular Aspects. *Developmental Biology* **238**: 64-78
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, Moll MD, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, Dipalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart J-M, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert J-M, Collen D, Persico MG (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine* **7**
- Carson F, Martin J, Lynn J (1973) Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* **59**: 365-373
- Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Bushman FD, Payen E, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P (2011) Is normal hematopoiesis maintained solely by long-term multipotent stem cells? *Blood* **117**: 4420-4424

- Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA (2009) Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytometry A* **75**: 14-24
- Challiera J-C, Galtiera M, Cortezb A, Binteina T, Rabreauc M, Uzan S (2005) Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta* **26**: 282-288
- Chao R, Gong X, Wang L, Wang P, Wang Y (2015) CD71high population represents primitive erythroblasts derived from mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research* **14**: 30–38
- Chhabra A, Lechner AJ, Ueno M, Acharya A, Handel BV, Wang Y, Iruela-Arispe ML, Tallquist MD, Mikkola HKA (2012) Trophoblasts regulate the placental hematopoietic niche through PDGF-B signaling. *Dev Cell* **22**: 651-659
- Ciau-Uitza A, Monteiro R, Kirmizitasa A, Patient R (2014) Developmental hematopoiesis: Ontogeny, genetic programming and conservation. *Experimental Hematology* **42**: 669–683
- Conrad KP, Benyo DF, al AW-Le (1996) Expression of erythropoietin by the human placenta. *FASEB J* **10**: 760-768
- Corbel C, Salaün J, Belo-Diabangouaya P, Dieterlen-Lièvre F (2007) Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois. *Developmental Biology* **301**: 478-488
- Cross JC (2005) How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice – A Review. *Placenta* **26**
- Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, D.G.Simmons, Yamamotoa H, Kingdom JCP (2003) Genes, Development and Evolution of the Placenta. *Placenta* **24**: 123-130
- Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Molecular and Cellular Endocrinology* **187**: 207-212
- Cross JC, Nakano H, Natale DRC, Simmons DG, Watson ED (2006) Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation* **74**: 393–401
- Cross JC SD, and Watson ED. Chorioallantoic morphogenesis, Ann afotpvt, NY Acad Sci 995: 84–93
- Crozatier M, Vincent A (2011) Drosophila: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Disease Models & Mechanisms* **4**: 439-445
- Cumano A, Furlonger C, Paige CJ (1993) Differentiation and Characterization of B-Cell Precursors Detected in the Yolk Sac and Embryo Body of Embryos Beginning at the 10- to 12-Somite Stage. *National Academy of Sciences* **90**: 6429-6433
- Cumano A, Godin I (2007) Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu Rev Immunol* **25**: 745–785

- Dancis J, Jansen V, Brown GF, Gorstein F, Balis ME (1977) Treatment of Hypoplastic Anemia in Mice with Placental Transplants. *Blood* **50**: 663-670
- Dancis J, Jansen V, Gorstein F, Douglas GW (1968) Hematopoietic cells in mouse placenta. *Obstet Gynecol* **100**
- Dancis J, Samuels BD, Douglas GW (1962) Immunological Competence of Placenta. *Science* **136**: 382-383
- Davies JE, Pollheimer J, Yong HEJ, Kokkinos MI, Kalionisa B, Knoflerc M, Murthi P (2016) Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adesion & Migration* **10**: 310-321
- Dellagi K, Vainchenker W, Vinci G, Paulin D, Brouet JC (1983) Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *The EMBO journal* **2**: 1509-1514
- Dewerchin M, Carmeliet P (2012) PlGF: A Multitasking Cytokine with Disease-Restricted Activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**
- Dieterlen-Lievre F (1975) On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* **33**: 607-619
- Downs K (2002) Early Placental Ontogeny in the Mouse. *Placenta* **23**: 116-131
- Downs K, Temkin R, Gifford S, McHugh J (2001) Study of the murine allantois by allantoic explants. *Developmental Biology* **233**: 347–364
- Drake CJ (2003) Embryonic and Adult Vasculogenesis. *Birth Defects Research (Part C)* **69**: 73-82
- Dumont DJ, Fong G-H, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML (1995) Vascularization of the Mouse Embryo: A Study of flk-1, tek, tie, and Vascular Endothelial Growth Factor Expression During Development. *Developmental Dynamics* **203**: 80-92
- Dzierzak E, Robin C (2010) Placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Trends Mol Med* **16**: 361-367
- Ebert BL, Bunn HF (1999) Regulation of the Erythropoietin Gene. *Blood* **94**: 1864-1877
- Ema H, Morita Y, Suda T (2014) Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* **42**: 74-82
- Falco SD (2012) The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental and Molecular Medicine* **44**: 1-9
- Fisher SJ (2015) Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* **213**: S115–S122
- Frame JM, E.McGrath K, Palis J (2013) Erythro-myeloid progenitors: “Definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stemcells. *Blood Cells, Molecules and Diseases* **51**: 220-225

- Fraser ST (2013) The Modern Primitives: Applying New Technological Approaches to Explore the Biology of the Earliest Red Blood Cells. *ISRN Hematol* **2013**
- Fraser ST, Isern J, Baron MH (2007) Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood* **109**: 343-352
- Furth Rv, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* **46**: 845–852
- Ganz T, Nemeth E (2012) Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1434–1443
- Gasperowicz M, Natale DRC (2011) Establishing Three Blastocyst Lineages—Then What? *Biology of Reproduction* **84**: 621-630
- Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HKA (2005) The Placenta Is a Niche for Hematopoietic Stem Cells. *Developmental Cell* **8**: 365–375
- Gekas C, Graf T (2013) CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* **121**: 4463-4472
- Gekas C, Rhodes KE, Handel BV, Chhabra A, Ueno M, Mikkola HKA (2010) Hematopoietic stem cell development in the placenta. *Int J Dev Biol* **54**: 1089-1098
- Georgiades P, Ferguson-Smith A, Burton G (2002) Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta* **23**: 3-19
- Gilbert SF (2003) *Biologia do Desenvolvimento*, 5a edição edn. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora.
- Ginhoux F, Guilliams M (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**: 439-449
- Glynn L, Schetter C, Chicz-DeMet A, Hobel C, Sandman C (2007) Ethnic differences in adrenocorticotrop hormone, cortisol and corticotropin-releasing hormone during pregnancy. *Peptides* **28**: 1155-1161
- Godin I, Cumano A (2002) The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nature Reviews Immunology* **2**: 593-604
- Golub R, Cumano A (2013) Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules and Diseases* **51**: 226–231
- Goodell M, Rosenzweig M, Kim H, Marks D, DeMaria M, Paradis G, Grupp S, Sieff C, Mulligan R, Johnson R (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature Medicine* **3**: 1337–1345

- Gross S, Helm K, Gruntmeir JJ, Stillman WS, Pyatt DW, Irons RD (1997) Characterization and phenotypic analysis of differentiating CD34+ human bone marrow cells in liquid culture. *Eur J Haematol* **59**: 318-326
- Guedes PT, Oliveira BCEPDD, Manso PPdA, Caputo LFG, Cotta-Pereira G, Pelajo-Machado M (2014) Histological Analyses Demonstrate the Temporary Contribution of Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow to Hematopoiesis during Chicken Development. *Plos One* **9**
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL (1994) Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* **371**: 333 - 336
- Gunsilius E, Gastl G, Petzer A (2001) Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother* **55**: 184-194
- Handel BV, Prashad SL, Hassanzadeh-Kiabi N, Huang A, Magnusson M, Atanassova B, Chen A, Hamalainen EI, Mikkola HKA (2010) The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood* **116**: 3321-3330
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MAS, Werb Z, Lyden D, Rafii S (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine* **8**: 841-849
- Heinig K, Sage F, Robin C, Sperandio M (2015) Development and trafficking function of haematopoietic stem cells and myeloid cells during fetal ontogeny. *Cardiovascular Research* **107**: 352–363
- Hemberger M, Dean W (2014) First Cell Fate Decisions in Early Development: Towards Establishment of the Trophoblast Lineage. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, Croy AB, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL (eds). Elsevier
- Hirano T, Higuchi T, Katsuragawa H, Inoue T, Kataoka N, Park KR, Ueda M, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S (1999) CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Mol Hum Reprod* **5**: 168-174
- Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R (2003) The two origins of hemocytes in Drosophila. *Development* **130**: 4955-4962
- Hu D, Cross JC (2011) Ablation of Tpbpa-positive trophoblast precursors leads to defects in maternal spiral artery remodeling in the mouse placenta. *Developmental Biology* **358**: 231-239
- Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G (2004) Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* **432**: 625-630
- Hughesa M, Natale BV, Simmons DG, Natale DRC (2014) Ly6e expression is restricted to syncytiotrophoblast cells of the mouse placenta. *Placenta* **34**: 831-835
- Isern J, Fraser ST, He Z, Baron MH (2008) The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *PNAS* **105**: 6662–6667

Isern J, He Z, Fraser ST, Nowotschin S, Ferrer-Vaquero A, Moore R, Hadjantonakis A-K, Schulz V, Tuck D, Gallagher PG, Baron MH (2011) Single-lineage transcriptome analysis reveals key regulatory pathways in primitive erythroid progenitors in the mouse embryo. *Blood* **117**: 4924-4934

Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP, Lapidot T (2016) Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* **0**: 1-19

Ji YQ, Zhang YQ, Li MQ, Du MR, Wei WW, Li DJ (2011) EPO improves the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast and decidual stromal cells through activating STAT-5 and inactivating p38 signal in human early pregnancy. *Int J Clin Exp Pathol* **4**: 765-774

Jollie WP, Haar JL, Craig SS (1975) Fine Structural Observations on Hemopoiesis in the Chorioallantoic Placenta of the Marmoset. *Am J Ana* **144**: 9-38

Kalluri R (2009) EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* **119**

Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420–1428

Kaufmann P, M. Mayhew T, Charnock-Jones DS (2004) Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. II. Changes During Normal Pregnancy. *Placenta* **25**: 114-126

Kauts M-L, Vink CS, Dzierzak E (2016) Hematopoietic (stem) cell development – how divergent are the roads taken? *FEBS Letters* **590**: 3975–3986

Kenchegowda D, Natale B, Lemus M, Natale DR, Fisher S (2017) Inactivation of maternal Hif-1 α at mid-pregnancy causes placental defects and deficits in oxygen delivery to the fetal organs under hypoxic stress. *Developmental Biology* **22**: 171–185

Kent DG, Copley MR, Benz C, StefanWohrer, Dykstra BJ, Ma E, Cheyne J, Zhao Y, Bowie MB, Zhao Y, Gasparetto M, Delaney A, Smith C, Marra M, Eaves CJ (2009) Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. **113**: 6342-6350

Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* **121**: 1109-1121

Kim CH (2010) Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of Blood Medicine* **1**: 13-19

Kim H-G, Guzman CGd, Swindle CS, Cotta CV, Gartland L, Scott EW, Klug CA (2004) The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* **104**: 3894-3900

Kinoshita T, Miyajima A (2002) Cytokine regulation of liver development. *Biochimica et Biophysica Acta* **1592**: 303-312

- Knapp DJ, Eaves CJ (2014) Control of the hematopoietic stem cell state. *Cell Research* **24**: 3-4
- Koury S, Bondurant M, Koury M, Semenza G (1991) Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* **77**: 2497-2503
- Kowalska-Kańska A, Maciejewski T, Niemiec KT (2013) The role and regulation of secretion of erythropoietin in pregnancy. *Developmental Period Medicine* **3**: 270-275
- Krauss T, Pauer HU, Augustin HG (2004) Prospective analysis of placenta growth factor (PlGF) concentrations in the plasma of women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* **23**: 101-111
- Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**: 637–643
- Lapchik V, Mattaria V, Ko M (2009) *Cuidados e Manejos de animais de laboratório*, São Paulo: Atheneu.
- Latos PA, Goncalves A, Oxley D, Mohammed H, Turro E, Hemberger M (2015) Fgf and Esrrb integrate epigenetic and transcriptional networks that regulate self-renewal of trophoblast stem cells. *Nature Communications* **6**
- Lee LK, Ghorbanian Y, Wang W, Wang Y, Kim YJ, Weissman IL, Inlay MA, Mikkola HKA (2016) LYVE1 Marks the Divergence of Yolk Sac Definitive Hemogenic Endothelium from the Primitive Erythroid Lineage. *Cell Reports* **17**: 2286-2298
- Lee LK, Ueno M, Handel BV, Mikkola HKA (2010) Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* **17**: 313-318
- Lennert K (1978) *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease: histology, cytology, ultrastructure, immunology*, Berlin: Springer.
- Lescisin KR, Varmuza S, Rossant J (1988) Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes & Development* **2**
- Li J, Smyth P, Cahill S, Denning K, Flavin R, Aherne S, Pirotta M, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O (2008) Improved RNA quality and TaqMan® Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnology* **8**
- Li Z, Lan Y, He W, Chen D, Wang J, Zhou F, Wang Y, Sun H, Chen X, Xu C, Li S, Pang Y, Zhang G, Yang L, Zhu L, Fan M, Shang A, Ju Z, Luo L, Ding Y, Guo W, Yuan W, Yang X, Liu B (2012) Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell* **11**: 663-675
- LihuiWang, Kounatidis I, Ligoxygakis P (2014) Drosophila as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**

- Luna RL, Kay VR, Ratsep MT, Khalaj K, Bidarimath M, Peterson N, Carmeliet P, Jin A, Croy BA (2016) PGF deficiency in mice deviates cerebrovascular development and impacts vessels of varying sizes. *Molecular Human Reproduction* **22**: 130-142
- Maglione D, Guerreiro V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9267-9271
- Malek A, Sager R, Eckardt K-U, Bauer C, Schneider H (1994) Lack of transport of erythropoietin across the human placenta as studied by an in vitro perfusion system. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **427**: 157-161
- Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ (2010) The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of Clinical Investigation* **120**: 1016-1025
- Marsee D, Pinkus G, Yu H (2010) CD71 (transferrin receptor) an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* **134**: 429-435
- Martinez-Agosto J, Mikkola H, Hartenstein V, Banerjee U (2007) The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* **21**: 3044-3060
- Mayer P (1903) Notiz über Hämatein und Häkalaun. *Z Wiss Mikrosk Mikrosk Tech* **20**
- McGrath KE, Palis J (2005) Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Experimental Hematology* **33**: 1021-1028
- McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, Loewer S, Philitas M, Curran M, Park PJ, Daley GQ (2009) Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood* **114**: 268-278
- Medvinsky A, Dzierzak E (1996) Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell* **86**: 897-906
- Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S (2011) Embryonic Origin of the Adult Hematopoietic System: Advances and Questions. *Development* **138**: 1017-1031
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**: 829-834
- Mikkola H (2009) ESAM: adding to the hematopoietic toolbox. *Blood* **113**
- Mikkola HKA, Fujiwara Y, Schlaeger TM, Traver D, Orkin SH (2003) Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* **101**: 508-516
- Mikkola HKA, Orkin SH (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**: 3733-3744
- Min S, Natale BV, Natale DRC (2017) Temporal and spatial expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) in the mouse placenta. *Placenta*

- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* **252**: 5558-5564
- Moore M, Owen J (1967) Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* **215**
- Moore MAS, Metcalf D (1970) Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18**: 279-296
- Morita Y, Ema H, Nakauchi H (2010) Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med* **207**: 1173-1182
- Morrison SJ, Hemmati H, Wandycz AM, Weissmant IL (1995) The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10302-10306
- Mould A, Morgan MAJ, Li L, Bikoff EK, Robertson EJ (2012) Blimp1/Prdm1 governs terminal differentiation of endovascular trophoblast giant cells and defines multipotent progenitors in the developing placenta. *Genes & Development* **26**: 2063-2074
- Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**: 291-301
- Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, Matsumoto Y, Yoshihara H, Suda T (2010) Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* **116**: 1422-1432
- Nascimento MCd, Abreu CLdC, Costa RN, Moura WCd, Delgado IF (2015) Potency Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Brazil: Assessment of Reproducibility Using a Practical Approach. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **58**: 562-568
- Ng AP, Alexander WS (2017) Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* **3**
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA (2001) Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**: 2293-2299
- North TE, F.T.R M, Bruijn d, Stacy T, Talebian L, Lind E, Robin C, Binder M, Dzierzak E, Speck NA (2002) Runx1 Expression Marks Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo. *Immunity* **16**: 661-672
- Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, Habib N, Yosef N, Chang CY, Shay T, Frampton GM, Drake ACB, Leskov I, Nilsson B, Preffer F, Dombkowski D, Evans JW, Liefeld T, Smutko JS, Chen J, Friedman N, Young RA, Golub TR, Regev A, Ebert BL (2011) Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* **144**: 296-309
- Ogawa M, Nishikawa S, Ikuta K, Yamamura F, Naito M, Takahashi K, Nishikawa S-I (1988) B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a

stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *EMBO J* **7**: 1337–1343

Ogura Y, Takakura N, Yoshida H, Nishikawa S (1998) Essential role of platelet-derived growth factor receptor alpha in the development of the intraplacental yolk sac/sinus of Duval in mouse placenta. *Biology of Reproduction* **58**: 65-72

Oguro H, Ding L, Morrison SJ (2013) SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* **13**: 102-116

Oh-McGinnis R, Bogutz A, Lefebvre L (2011) Partial loss of *Ascl2* function affects all three layers of the mature placenta and causes intrauterine growth restriction. *Developmental Biology* **35**: 277-286

Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**: 631–644

Ottersbach K, Dzierzak E (2005) The Murine Placenta Contains Hematopoietic Stem Cells within the Vascular Labyrinth Region. *Developmental Cell* **8**: 377–387

Outhwaite JE, Natale BV, Natale DRC, Simmons DG (2015) Expression of aldehyde dehydrogenase family 1, member A3 in glycogen trophoblast cells of the murine placenta. *Placenta* **36**: 304-311

Palis J, Yoder MC (2001) Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology* **29**: 927-936

Parast MM, Aeder S, Sutherland AE (2001) Trophoblast Giant-Cell Differentiation Involves Changes in Cytoskeleton and Cell Motility. *Developmental Biology* **230**: 43-60

Pel Mv, Fibbe WE, Schepers K (2016) The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1370**: 55-64

Petrenko O, Beavis A, Klaine M, Kittappa R, Godin I, Lemischka IR (1999) The Molecular Characterization of the Fetal Stem Cell Marker AA4. *Immunity* **10**: 691-700

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**

Ponder KL, Bárcena A, Bos FL, Gormley M, Zhou Y, Ona K, Kapidzic M, Zovein AC, Fisher SJ (2016) Preeclampsia and Inflammatory Preterm Labor Alter the Human Placental Hematopoietic Niche *Reproductive Sciences* **23**: 1179-1192

Portilho NA (2013) Estudo Histológico da Placenta Murina com enfoque em seu potencial Hematopoético. Mestrado Thesis, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

Portilho NA, Guedes PT, Croy BA, Pelajo-Machado M (2016) Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta. *Placenta* **47**: 1-11

- Pourcelot E, Lénon M, Mobilia N, Cahn J-Y, Arnaud J, Fanchon E, Moulis J-M, Mossuz P (2015) Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: Nailing down the intracellular functional iron concentration. *Biochimica et Biophysica Acta* **1853**: 1596–1605
- Rafii S, Avecilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MAS, Heissig B, Hattori K (2003) Angiogenic Factors Reconstitute Hematopoiesis by Recruiting Stem Cells from Bone Marrow Microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences* **996**: 49-60
- Rai A, Cross JC (2014) Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Developmental Biology* **387**: 131-141
- Rai A, Cross JC (2015) Three-dimensional cultures of trophoblast stem cells autonomously develop vascular-like spaces lined by trophoblast giant cells. *Developmental Biology* **398**: 110-119
- Ratsep MT, Carmeliet P, Adams MA, Croy BA (2014) Impact of placental growth factor deficiency on early mouse implant site angiogenesis. *Placenta* **35**: 772-775
- Rawn SM, Cross JC (2008) The Evolution, Regulation, and Function of Placenta-Specific Genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 159-181
- Redhead ML, Portilho NA, Felker AM, Mohammad S, Mara DL, Croy BA (2016) The Transcription Factor NFIL3 Is Essential for Normal Placental and Embryonic Development but not for Uterine Natural Killer (UNK) Cell Differentiation in Mice. *Biology of Reproduction* **94**
- Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC, Mikkola HKA (2008) The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell* **2**: 252-263
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E (2009) Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**: 101-111
- Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, Lauw I, Kaimakis P, Jorna R, Vermeulen M, Kayser M, Linden Rvd, Imanirad P, Verstegen M, Nawaz-Yousaf H, Papazian N, Steegers E, Cupedo T, Dzierzak E (2009) Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development. *Cell Stem Cell* **5**: 385–395
- Robin C, Ottersbach K, Boisset J-C, Oziemlak A, Dzierzak E (2011) CD41 is developmentally regulated and differentially expressed on mouse hematopoietic stem cells. *Blood* **117**
- Rossant J, Cross JC (2001) Placental Development: Lessons from Mouse Mutants. *Nature Reviews Genetics* **2**: 538-548
- Rossert J, Eckardt K-U (2005) Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant* **20**: 1025-1028
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Hoff MJBvd, Moorman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**

- Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SAJR, Carlton MBL, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ (2000) Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**
- Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, S.Woll P, Luis TC, AdamMead, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Jones TB, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JCA, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark S-A, Nerlov C, Jacobsen SEW (2013) Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**: 232-236
- Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K, Sugiyama D (2010) Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse. *Development* **137**: 3941-3952
- Scandura JM, Boccuni P, Massagué J, Nimer SD (2004) Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15231–15236
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**: 7-25
- Seita J, Weissman IL (2010) Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**: 640–653
- Shi X, Yang J, Zhu H, Ye L, Feng M, Li J, Huang H, Tao Q, Ye D, Sun L-H, Sun BNC, Sun CRY, Han G, Liu Y, Yao M, Zhou P, Ju D (2013) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human EPO-Fc Fusion Protein In Vivo. *PloS One* **8**
- Simmons DG (2014) Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, Croy AB, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL (eds). Elsevier
- Simmons DG, Cross JC (2005) Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Developmental Biology* **284**: 12-24
- Simmons DG, Fortier AL, Cross JC (2007) Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Developmental Biology* **304**: 567-578
- Simmons DG, Natale DRC, Begay V, Hughes M, Leutz A, Cross JC (2008a) Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. *Development* **135**: 2083-2091
- Simmons DG, Rawn S, Davies A, Hughes M, Cross JC (2008b) Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. *BMC Genomics* **9**
- Soncin F, Natale D, Parast MM (2015) Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. *Cell Mol Life Sci* **72**: 1291–1302
- Soza-Ried C, Hess I, Netuschil N, Schorpp M, Boehm T (2010) Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *PNAS* **107**

- Sugiyama D, Inoue-Yokoo T, Fraser ST, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y (2011) Embryonic Regulation of the Mouse Hematopoietic Niche. *ScientificWorldJournal* **11**: 1770–1780
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**: 977-988
- Swain A, Inoue T, Tan K, Nakanishi Y, Sugiyama D (2014) Intrinsic and extrinsic regulation of mammalian hematopoiesis in the fetal liver. *Histol Histopathol* **29**: 1077-1082
- Swiers G, Baumann C, O'Rourke J, Giannoulatou E, Taylor S, Joshi A, Moignard V, Pina C, Bee T, Kokkaliaris KD, Yoshimoto M, Yoder MC, Frampton J, Schroeder T, Enver T, Gottgens B, Bruijn MFTRd (2013) Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nature Communications* **4**
- Tamma R, Ribatti D (2017a) Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 151
- Tamma R, Ribatti D (2017b) Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *Int J Mol Sci* **18**
- Taoudi S, Morrison AM, Inoue H, Gribi R, Ure J, Medvinsky A (2005) Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver. *Development and disease* **132**: 4179-4191
- Tavian M, Biasch K, Sinka K, Vallet J, Péault B (2010) Embryonic Origin of Human hematopoiesis. *Int J Dev Biol* **54**: 1061-1065
- Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, Foster RA, Croy BA (2007) Genetic Deletion of Placenta Growth Factor in Mice Alters Uterine NK Cells. *The Journal of Immunology* **178**: 4267-4275
- Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**: 213-222
- Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, Mesy-Bentley KKLd, Waugh R, Palis J (2007) The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* **109**: 1433-1441
- Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ (2003) Expression and Function of Placenta Growth Factor: Implication for Abnormal Placentation. *J Soc Gynecol Investig* **10**
- Toth B, Fischl A, Scholz C, Kunze S, Friese K, Jeschke U (2008) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in normal and disturbed pregnancy. *Reproductive Biology* **140**: 192-200
- Ueno H, Weissman IL (2006) Clonal Analysis of Mouse Development Reveals a Polyclonal Origin for Yolk Sac Blood Islands. *Developmental Cell* **11**: 519-533

- Ueno M, Lee LK, Chhabra A, Kim YJ, Sasidharan R, Handel BV, Wang Y, Kamata M, Kamran P, Sereti K-I, Ardehali R, Jiang M, Mikkola HKA (2013) c-Met-dependent multipotent labyrinth trophoblast progenitors establish placental exchange interface. *Developmental Cell* **27**: 373–386
- Uy GD, Downs KM, Gardner RL (2002) Inhibition of trophoblast stem cell potential in chorionic ectoderm coincides with occlusion of the ectoplacental cavity in the mouse. *Development* **129**: 3913-3924
- Vacaru AM, Isern J, Fraser ST, Baron MH (2013) Analysis of primitive erythroid cell proliferation and enucleation using a cyan fluorescent reporter in transgenic mice. *Genesis* **51**: 751-762
- Vandewoestyne M, Goossens K, Burvenich C, Soom AV, Peelman L, Deforce D (2013) Laser capture microdissection: Should an ultraviolet or infrared laser be used? *Analytical Biochemistry* **439**: 88-98
- Veazey KJ, Golding MC (2011) Selection of Stable Reference Genes for Quantitative RT-PCR Comparisons of Mouse Embryonic and Extra-Embryonic Stem Cells. *Plos One* **6**
- Walentin K, Hinze C, Schmidt-Ott KM (2016) The basal chorionic trophoblast cell layer: An emerging coordinator of placenta development. *Bioassays* **38**: 254-265
- Watson ED, Cross JC (2005) Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *Physiology* **20**: 180-193
- Wilson A, Trumpp A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology* **6**: 93-106
- Woolthuis CM, Park CY (2016) Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood* **127**: 1242-1248
- Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL (2001) Physiological Migration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Science* **294**
- Wu A, Till J, Siminovitch L, McCulloch E (1967) A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* **69**: 177-184
- Wynne F, Ball M, McLellan AS, Dockery P, Zimmermann W, Moore T (2006) Mouse pregnancy-specific glycoproteins: tissue-specific expression and evidence of association with maternal vasculature. *Reproduction* **131**: 721-732
- Yamamoto K, Miwa Y, Suzuki SA, Abe S, Kirimura S, Onishi I, Kitagawa M, Kurata M (2016) Extramedullary hematopoiesis: Elucidating the function of the hematopoietic stem cell niche (Review). *Molecular Medicine Reports* **13**: 587-591
- Yasuda Y, Okano M, Nagao M, Masuda S, Fujita Y, Sasaki R (2002) Erythropoietin and erythropoietin-receptor producing cells demonstrated by in situ hybridization in mouse visceral yolk sacs. *Anatomical Science International* **77**: 58-63

- Yokomizo T, Dzierzak E (2010) Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos. *Development* **137**: 3651-3661
- Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Williams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**: 79-91
- Yumine A, Fraser ST, Sugiyama D (2017) Regulation of the embryonic erythropoietic niche: a future perspective. *Blood Research* **52**: 10-17
- Zeigler BM, Sugiyama D, Chen M, Guo Y, M K, Downs, Speck NA (2006) The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential. *Development* **133**: 4183-4192
- Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* **119**: 1429–1437
- Zhang C, Lodish H (2008) Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* **15**: 307-311
- Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS (2001) The Regulation and Localization of Angiopoietin-1, -2, and Their Receptor Tie2 in Normal and Pathologic Human Placentae. *Molecular Medicine* **7**: 624-635
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**: 836-841
- Zhao M, Li L (2016) Dissecting the bone marrow HSC niches. *Cell Research* **26**: 975-976
- Zhou X, Barsky LW, Adams GB (2013) Placental Growth Factor Expression Is Required for Bone Marrow Endothelial Cell Support of Primitive Murine Hematopoietic Cells. *Plos One* **8**
- Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, A.Turlo K, Yang Y, Becker MS, Zanetta L, Dejana E, Gasson JC, Tallquist MD, Iruela-Arispe ML (2008) Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **3**: 625–636

8 ANEXOS

Os resultados obtidos nesta tese entram nos seguintes manuscritos:

- **Publicados**

Portilho NA, Guedes PT, Croy BA, Pelajo-Machado M (2016). Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta. *Placenta*. 47: 1-11.

- **Em fase de redação**

Portilho NA, Calvo TL, Pinto TGT, Moraes M, Croy BA, Pelajo-Machado M. The role of placenta in the ontogeny of hematopoietic system: origin, spacial distribution and phenotypical and gene expression profile of hematopoietic cells. Em preparação.

Portilho NA, Pelajo-Machado M. Mechanism of vasculogenesis and hematopoiesis in mouse placenta. Artigo de revisão para a edição especial (*special issue*) na revista *Placenta*.

Artigo publicado durante o desenvolvimento da tese:

Redhead ML, Portilho NA, Felker AM, Mohammad S, Mara DL, Croy BA (2016). The Transcription Factor NFIL3 Is Essential for Normal Placental and Embryonic Development but not for Uterine Natural Killer (UNK) Cell Differentiation in Mice. *Biol Reprod*. 94:101.



Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta



Nathália Azevedo Portilho^{a, c, *}, Priscila Tavares Guedes^b, B. Anne Croy^c,
Marcelo Pelajo-Machado^a

^a Laboratory of Pathology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, 21040-900, Brazil

^b Department of Morphological Sciences, Federal University of the State of Rio de Janeiro/ UNIRIO, Rio de Janeiro, 20211-010, Brazil

^c Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON, K7L3N6, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2016

Received in revised form

9 August 2016

Accepted 22 August 2016

Keywords:

Placenta

Mouse

Hematopoiesis

Erythropoiesis

ABSTRACT

Previous studies have shown that human and mouse placentas have hematopoietic potential during mid-gestation. In this investigation, we used histological and immunohistological approaches to visualize hematopoietic cells in mouse placenta between 9.5 and 12.5 days of gestation (gd), identifying their topography and niche. Putative hematopoietic foci were present on 10.5 and 11.5 gd but not 9.5 or 12.5 gd and was restricted to the placental labyrinth. Two major niches each with distinctive hematopoietic cell clusters were present. One type of hematopoietic cell cluster involved the chorioallantoic vasculature and fetal vessels near the chorionic plate. These clusters resembled the hematopoietic stem cells produced by large embryonic arteries such as aorta that persist in postnatal marrow. The other type of hematopoietic cell cluster identified was at the opposite side of labyrinth next to the junctional zone and was composed of erythropoietic foci. Our results suggest that mouse placenta not only produces hematopoietic stem/progenitor cells but also a second wave of primitive erythrocytes that may support a rapid, mid-pregnancy, fetal growth trajectory. Our data also point to a close relationships in the origins of hematopoietic and endothelial cells within placenta.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Hematopoiesis is a vital process that begins during embryonic development. Blood cell forming activity is sequential in different fetal organs and continues postnatally mostly in bone marrow. In human, mouse and other mammalian embryos, hematopoietic cells first appear in blood islands of the extra-embryonic yolk sac. Yolk sac progenitor cells give rise to transient nucleated erythrocytes, macrophages and megakaryocytes [1–3]. Because cells of these initial early lineages differ from their counterparts produced later in gestation or during adult life, this first wave of hematopoietic production is known as primitive [4]. Blood islands are comprised of masses of mesodermal cells known as hemangioblasts. In mice, hemangioblasts arise from visceral yolk sac cells around 7.5 gestational days (gd) and give rise predominantly to endothelial cells and primitive erythrocytes that mature semi-synchronously into new

vessels [5,6]. As development progresses, primitive erythrocytes are gradually superseded by progeny from progenitor cells that are able to differentiate into more complex hematopoietic cell lineages. This second wave of hematopoiesis, called definitive hematopoiesis, takes place within large vessels of the embryo itself (such as dorsal aorta) and in the vitelline and umbilical arteries [7–11]. The hematopoietic progenitor cells from this latter wave migrate to fetal liver where they expand and differentiate. Mouse fetal liver is seeded by transient yolk sac vessel-derived erythro-myeloid progenitor cells at 8.5 gd and then by hematopoietic stem cell (HSC) from the large embryonic arteries about 11.5 gd. Fetal liver then provides the inductive niche for myelopoiesis and erythropoiesis during the second half of pregnancy. Definitive hematopoietic cells and non-nucleated erythrocytes from the latter hematopoietic wave appear in fetal blood by 12.5 gd and eventually replace primitive, nucleated erythrocytes. Towards the end of gestation (after 15.5 gd), HSCs migrate from the fetal liver to cavitating bones where they persist in bone marrow throughout postnatal life [12–15].

Placental hematopoiesis is also reported. Morphological analyses of human placentae recently identified first trimester

* Corresponding author. Laboratory of Pathology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil.

E-mail address: nath.portilho@hotmail.com (N. Azevedo Portilho).

hemangioblast foci that resembled yolk sac foci of primitive erythropoiesis. These placental foci occurred in villous mesenchyme beneath trophoblasts. It was postulated that developing erythroid and endothelial cells of the placenta elongate towards the chorionic plate to integrate with components that arose within the embryonic circulation [16,17]. Human placenta is also believed to contribute to definitive hematopoiesis. Cells exhibiting hematopoietic progenitor and HSC markers can be isolated from human placentas by gestation week 6 and onwards [18,19]. *In vitro* assays for hematopoietic colony formation showed that CD34⁺⁺CD45^{low} cells isolated from chorionic villi differentiate into myeloid cells, erythroid cells and some leucocyte lineages [19]. CD34⁺CD38⁻ human placental cells not only demonstrate multi-lineage, clonogenic potential but also engraft and differentiate in immune deficient mice, defining them as long-term HSC. Immunostaining of first trimester human placentas suggests that early HSCs are in close contact with vascular elements [18].

Mouse placental hematopoiesis is also documented via clonogenic and other functional assays. Multipotent, short-term hematopoietic progenitors and long-term repopulating HSC were identified at 9.0 gd and had expanded by 12 and 13 gd. These cells were highly proliferative and more abundant than in fetal organs. Immunohistochemistry, *in situ* hybridization and transgenic mice have been useful tools for characterization of hematopoietic cells and their niche in the mouse placenta [20–24]. Cells, including HSC, that express hematopoietic progenitor markers such as *Sca1*, c-KIT, and integrin alpha 2b (CD41), are observed within chorioallantoic mesenchyme and fetal vessels of the placental labyrinth over mid-gestation. Some of these cells co-express endothelial markers revealing close associations between these two lineages [22–24]. CD41⁺ cells were identified in placental vessels of transgenic mice prior to onset of a fetal heartbeat, suggesting that at least some hematopoietic progenitors are intrinsic to placenta [23]. Multiple authors suggest that vessels of the placental labyrinth generate these multilineage progenitors and provide a suitable niche for lineage expansion [21–24]. In contrast to human placenta, earlier, primitive erythropoiesis has not been reported in mouse placenta.

The mouse placental labyrinth forms subsequent to fusion of the chorion (mesothelium and extraembryonic ectoderm) and allantois (mesoderm), that begins at 8.5 gd. Allantoic vessels undergo branching towards chorionic folds and by 9.5 gd, the interhemal membrane that separates fetal and maternal blood is present. Between 10.5 and 11.5 gd, the labyrinthine cell layers become functionally organized and are structurally constant throughout the rest of pregnancy [25,26]. Isolated chorion and isolated allantois have each been shown to contain cells capable of forming myeloid colonies *in vitro*, indicating intrinsic hematopoietic potential of these two structures [27,28]. However, placental contributions to hematopoietic ontogeny remain poorly understood. In the present work, histological and immunohistological approaches were successfully used to seek evidence for earlier, primitive erythropoiesis in mouse placenta and to visualize and localize the sites of later, definitive hematopoiesis.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Experimental animal procedures conducted in Brazil were approved by Ethical Commission of Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA, Authorization Number LW-44/13) based on the principles of the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL). Procedures conducted in Canada used protocols approved by the Animal Care Committee, Queen's University and complaint with Guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.2. Mice

Swiss Webster mice aged 2–3 months were provided by Animal Laboratory Center of the Oswaldo Cruz Foundation (CECAL). For some immunofluorescence studies, C57BL/6 (B6) females purchased from Charles River Canada, St. Constant, QU were mated to B6 males with ubiquitous green fluorescent protein (GFP) transgene expression that was incidental in the reported experiments. For all studies, males and females were housed under 12 h-light/dark cycles and received food and water *ad libitum*. The morning of copulation plug detection was considered 0.5 gd. Thirty-seven pregnant females were studied with 9.5 gd (7), 10.5 gd (20), 11.5 gd (8) and 12.5 gd (2). Mice were euthanized in the morning on each experimental day as described below.

2.3. Sampling and histology processing

Pregnant females received a lethal intraperitoneal injection of Ketamin-Xylazin (0.1 ml/12–15 g) (Syntec) at 9.5, 10.5, 11.5 or 12.5 gd. Each uterus was transected into implantation sites which were placed into Carson's Millionig formalin [29] for 48 h, then halved sagittally. Specimens were processed into paraffin using a Shandon Citadel 2000 tissue processor (Thermo, USA) according to standard methodology. Every implantation site in each pregnant female was analyzed using 5 µm serial sections. Every tenth section was de-waxed, hydrated and washed in distilled water prior to staining with Mayer's hematoxylin-eosin (H&E). Alternatively, the implant sites were embedded in OCT compound and flash frozen in liquid nitrogen. These samples were stored in a –80 °C freezer until 6 µm sectioning using a cryostat (Leica).

Characterization of putative hematopoietic foci used immunofluorescence. Paraffin sections were de-waxed, hydrated and incubated in sodium citrate buffer (pH 6.0) prior to antigen retrieval in a Pascal chamber (Dako, USA), according to the manufacturer's recommendations. The slides were incubated in a humid chamber overnight at 4 °C with primary antibodies (Table 1) or phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and isotype for negative controls. Slides were washed in PBS and incubated with secondary antibody for 1 h at 37 °C when necessary (Table 1). Some tissue sections were counterstained with 1:10,000 Evans Blue (Sigma, EUA) and 1:5000 DAPI (03571, Molecular Probes, USA) and mounted in ProlongGold (P36934, Life Technologies, USA). Others were mounted in ProlongGold with DAPI (P36931, Life Technologies).

H&E images were analyzed in an AxioObserver Z1 microscope (Zeiss, Germany) and documented in a digital AxioCam MRc5 or HRC cameras (Zeiss Vision, Germany). Some sections were digitally scanned using a VSlide imaging automation platform (MetaSystems, Germany) mounted onto a motorized AxioImager Z1 (Zeiss, Germany). Immunofluorescent slides were analyzed in an LSM 510 META confocal microscope or AxioCam-equipped Zeiss M1 imager (Zeiss; Toronto, ON, Canada). Confocal set-ups including an Ar488 laser and BP510-530 filter (AlexaFluor488/FITC), HeNe543 laser and LP560 filter (Evans Blue), and 405 diode laser and BP420-480 filter (DAPI). The images were processed using Adobe Photoshop.

3. Results

3.1. Temporal assessment of the placenta for hematopoietic progenitor cells

Mouse placenta is composed of maternal and zygote-derived cells. Bordering maternal decidua is a thin layer of zygote-derived, parietal trophoblast giant cells (TGC). These giant cells and the adjacent spongiotrophoblast cells form the junctional zone

Table 1
Antibodies reagents used.

Product name	Description	Supplier	Specificity	Secondary antibody ^a
Anti-Sca1/Ly6A/E antibody [D7] – FITC	rat monoclonal	Abcam	Stem cells antigen-1, a cell surface protein of HSC	–
Anti-RUNX1/AML1 antibody	rabbit polyclonal	Abcam	Transcription factor pivotal in emergence of definitive hematopoietic cells	Alexa Fluor 488 – Goat anti-rabbit
Anti-CD41 antibody – FITC	rat	Biolegend	Transmembrane glycoprotein expressed by platelets, megakaryocytes and hematopoietic progenitors	–
anti-VIII-R Factor (vWf) antibody	rabbit polyclonal	Cell Marque	Endothelial cells	Alexa Fluor 488 – Goat anti-rabbit
Anti-Vimentin antibody [EPR3776]	rabbit monoclonal	Abcam	Vimentin Cytoskeleton Marker	Alexa Fluor 594 – Goat anti-rabbit
anti-pan-cadherin (C-19) antibody	goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cadherins adhesion molecules	Alexa Fluor 488 – Donkey anti-goat
anti-Epo antibody (N-19)	goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Erythropoietin	Alexa Fluor 488 – Donkey anti-goat
Anti-Hepcidin-25 antibody	rabbit polyclonal	Abcam	Signaling molecule involved in the maintenance of iron homeostasis: absorption and iron storage.	Alexa Fluor 488 – Goat anti-rabbit
<i>Arachis hypogaea</i> lectin (PNA) – FITC	–	Sigma-Aldrich	Gal-β(1–3)-GalNAc	–
Cytokeratin 8, Endo-A	Rat monoclonal	Hybridoma Bank	Trophoblast	Alexa Fluor 488 – Goat anti-rat

^a All secondary antibodies were purchased from Invitrogen except the secondary antibody Alexa Fluor 488 – Goat anti-rat that was purchased from abcam.

(Fig. 1A). The labyrinth is the innermost placental layer and site of maternal-fetal exchange. Cords and islands of trophoblast cells separate maternal and fetal vascular channels in the labyrinth. Maternal blood channels are filled by non-nucleated erythrocytes and lined by trophoblast cells not endothelium (Fig. 1B–E). At 9.5 gd, vessels from the allantoic mesenchyme invade the chorionic plate and branch into fetal labyrinthine vessels (Supplemental Fig. 1A). Fetal labyrinthine vessels contain erythroblasts and nucleated erythrocytes. In comparison to maternal erythrocytes, fetal erythrocytes appeared larger, irregular in shape and most of them exhibited intense cytoplasmic acidophilia due to hemoglobin content. Fetal erythrocyte nuclei were compact with dense chromatin (Fig. 1B–E; Supplemental Fig. 1A, B). Similar nucleated erythrocytes were observed at the other gestational ages studied suggesting these are circulating cells within fetal labyrinthine vessels (Fig. 1C–E; Supplemental Fig. 1C, D). Two morphologically indistinguishable layers of syncytiotrophoblast and a thin endothelium were occasionally observed bordering the fetal blood cells (Fig. 1B–D; Supplemental Fig. 1C), particularly by 11.5 gd (Fig. 1E; Supplemental Fig. 1D).

Hematopoietic activity was present only on 10.5 and 11.5 gd and appeared to be restricted to the placental labyrinth. Morphologically-distinctive hematopoietic cell clusters were detected in specific regions of the labyrinth for most of the placentas obtained from 10.5 gd (18/20 pregnancies) and 11.5 gd (4/8 pregnancies) as discussed in detail below. The vast number of sections were negative for hematopoietic foci precluding making an estimate of their frequency. For positive placentae, about four foci were present per placenta.

3.2. Clusters of hematopoietic cells near chorionic plate of 10.5 and 11.5 gd placentas: definitive hematopoiesis?

Clusters of immature hematopoietic cells were observed in the chorioallantoic vasculature and in labyrinthine fetal vessels near the chorionic plate. These clusters were never observed at 9.5 or 12.5 gd. The clustered cells were all immature and similar to each other. They were small, round-shaped, and basophilic with large nuclei and little cytoplasm (Fig. 2A–E). Two prominent nucleoli were usually visible (Fig. 2B). These immature cells appeared attached to each other and to the adjacent endothelium by one or a few cells that protruded from fetal vessels walls. Cells with similar phenotype appeared to circulate in fetal labyrinthine vessels close

to these clusters (Fig. 2F). Staining of whole-mounted intact tissue at 10.5 gd with antibodies to CD31 (endothelium) and CD41 (immature hematopoietic cells) revealed clusters of CD41⁺ cells inside a fetal labyrinthine vessel judged to be at the chorionic plate by its wide diameter (Supplemental Fig. 2). These cell clusters were morphologically similar to long-term repopulating hematopoietic stem cells found at 10.5 gd in umbilical vessels and the dorsal aorta (Supplemental Fig. 3A,B).

3.3. Placental labyrinth near the junctional zone is a site for erythropoiesis at 10.5 and 11.5 gd

The labyrinth close to the junctional zone of 10.5 and 11.5 gd placentas was identified for the first time as a site of erythropoiesis. At this location, unique clumps of tightly packed erythrocytes differing in their stages of differentiation were found as foci (Fig. 3). These erythropoietic foci consisted of large erythrocytes attached to each other and to immature hematopoietic cells forming an intricate conglomerate. Some erythropoietic foci were in close contact with trophoblast islands at sites that appeared to lack endothelial cells or an enclosing vessel (Fig. 3A). When these complex erythropoietic foci were clearly inside a blood vessel, the hematopoietic cells seemed adherent to each other and sometimes to the adjacent wall (Fig. 3B–F).

Immature hematopoietic cells in the complex erythrocytic foci close to the junctional zone were larger than the immature hematopoietic cells found in the erythroid clusters close to the chorionic plate (Fig. 2A–D). Immature hematopoietic cells close to the junctional zone foci had a large, central nucleus that occupied almost the entire cell volume. One or two strikingly prominent nucleoli were present in these cells (Fig. 3). Similar, immature, large cells were also loosely arranged with other erythrocytes (Fig. 4A, B). Sometimes these cells were clearly attached to each other within vessels (Fig. 4C), suggesting they were organized as a cluster prior to their release into the circulation. Some immature hematopoietic cells with two prominent nucleoli had a cytoplasmic coloration indicative of hemoglobin and may represent erythroblast cells (Fig. 4C–E).

The mature erythrocytes found in the labyrinth close to the junctional zone, differed in morphology from the nucleated erythrocytes described at the chorionic plate which were smaller, more irregular in shape and had denser chromatin staining (Fig. 1). Although both cell types were nucleated, the 10.5 and 11.5 gd erythrocytes near the junctional zone were larger, spherical in

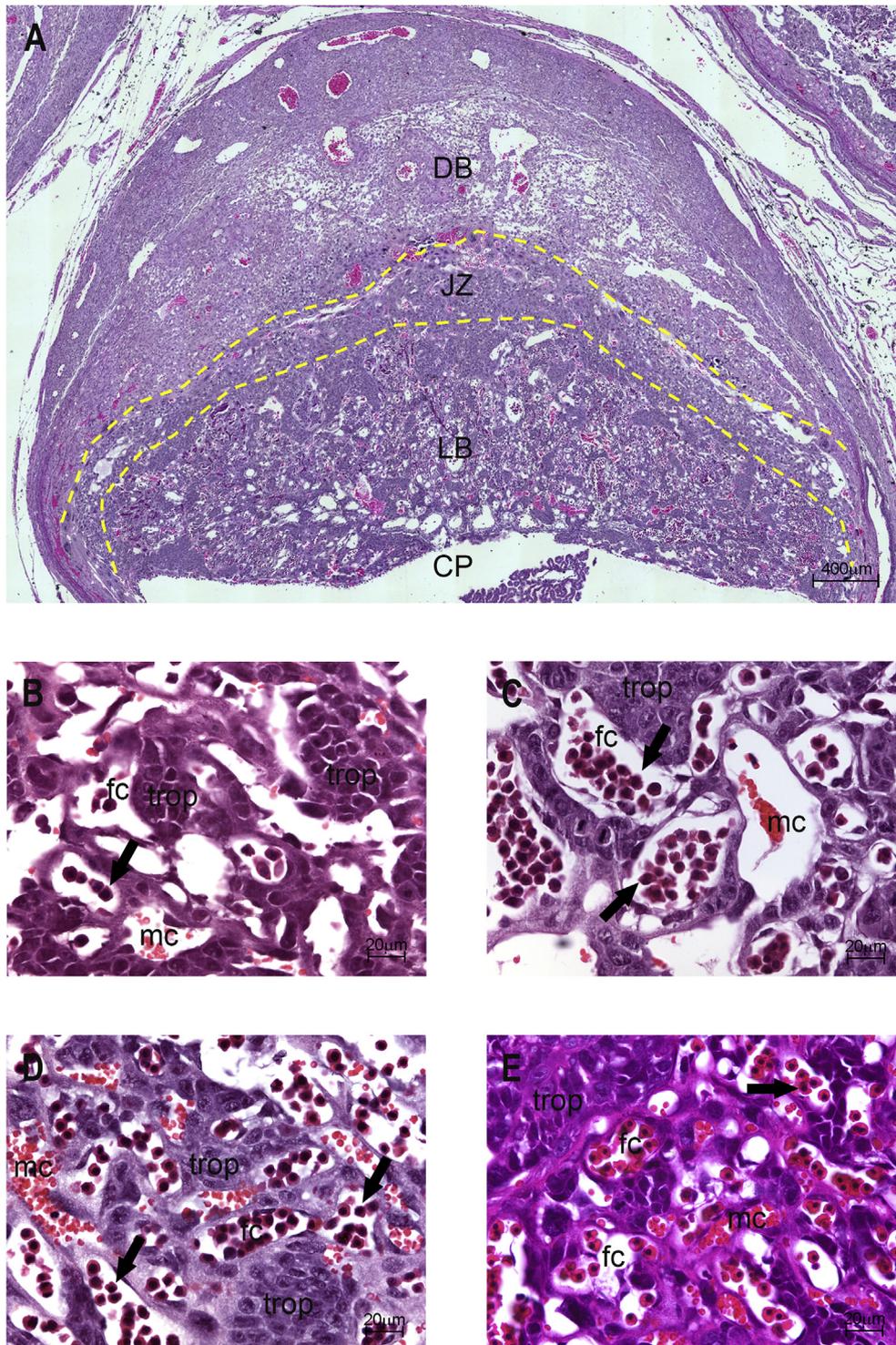


Fig. 1. Mouse placenta over mid-gestation. (A) Panoramic view of mouse placenta at 11.5 gestational days (gd). This sagittal cut showed the regions of placenta: decidua basalis (DB), trophoblast giant cells and spongiotrophoblast forming the junctional zone (JZ) and labyrinth (LB). Major fetal blood vessels of chorionic plate (CP) are not visible in this section. Labyrinthine regions at 9.5 gd (B), 10.5 gd (C), 11.5 gd (D) and 12.5 gd (E) showed maternal (mc) and fetal (fc) vascular channels intermingled in cords and islands of trophoblast cells (trop). Nonnucleated erythrocytes filled maternal blood channels while nucleated erythrocytes filled fetal blood channels (arrows). Between these two circulations there was an interhemal membrane constituted by fetal endothelial cells, syncytiotrophoblast and mononuclear trophoblast cells.

shape and had less dense chromatin staining (Fig. 4A–E; Supplemental Fig. 1C). The differences in nuclear arrangement suggested the larger erythrocytes were more immature, and they were designated intermediate erythrocytes. Numerous mitotic figures were observed in the intermediate erythrocytes (Fig. 4D)

that sometimes appeared to lack surrounding endothelial cells (Fig. 4D, E). PNA lectin, an endothelial cell stain, improved visualization of the discontinuous endothelium in these fetal channels (Fig. 4F). Intermediate erythrocytes co-expressed membrane cadherin (Fig. 5B).

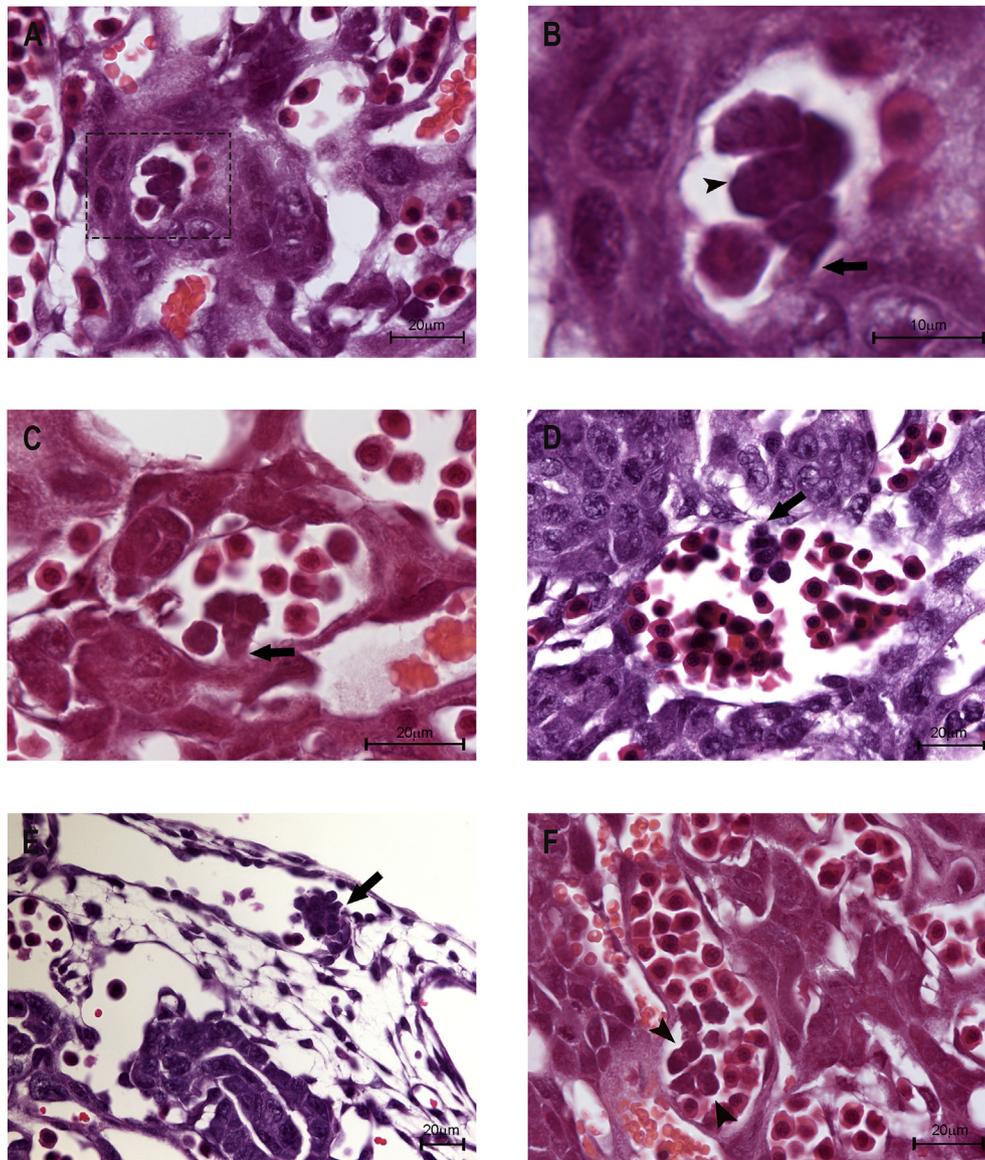


Fig. 2. Clusters of hematopoietic cells in labyrinthine region near the chorionic plate. (A–E) Clusters of immature hematopoietic cells protruded toward the lumen of labyrinth fetal vessels (A: into rectangle; B–D: arrows) and into the chorioallantoic vasculature (E: arrow). The immature hematopoietic cells of these clusters appeared to be attached to each other and to the adjacent endothelium by one or few cells (A–E: arrows). The morphological details of these immature hematopoietic cells are better observed in fig. B, which demonstrates the area limited by rectangle in fig. A at a higher magnification: round and small cells, very basophilic (arrowheads) whose nucleus was large and occupied the most part of the cell. Sometimes, two prominent nucleoli were visible (B: arrowhead). (F) A group of free cells into fetal blood circulation had the same morphological features (arrowheads). A–C, E, F: 10.5 gd. D: 11.5 gd.

The composition of the junctional zone erythropoietic foci (immature cells plus erythrocytes at different stages of differentiation) suggests *in situ* erythropoietic differentiation. The morphologic similarities between the tightly and more loosely packed erythropoietic foci suggest that immature hematopoietic cells differentiate into erythroblasts *in situ* and then into erythrocytes gradually entering the circulation. Cadherin was examined as a candidate adhesion molecule for these foci. The packed erythrocyte foci were cadherin membrane-reactive as were trophoblast cells (Fig. 5A). Vimentin, an intermediate filament expressed by cells of mesenchymal origin, was strongly expressed by endothelial cells in the placental labyrinth. In some vessels close to the junctional zone, erythrocytes within tightly packed foci were also vimentin positive (Fig. 3F). Steps in the generation of placental erythrocytes appear to be transient and quite similar to primitive yolk sac erythropoiesis.

Indeed, placental erythropoietic foci morphologically resemble 7 and 8 gd yolk sac blood Islands (Supplemental Fig. 4).

Immunofluorescence confirmed the immature nature of some cells in the erythropoietic foci (Fig. 5C–E). Foci contained Sca1+ or CD41+ cells. Some cells within most foci were also reactive with the endothelial marker von Willebrand factor (vWf) (Fig. 5F). Of note, most labyrinthine endothelium did not express this molecule while all endothelial cells of maternal decidua and myometrium were vWf+. A few labyrinthine fetal vessels close to the chorionic plate reacted with vWf+.

The cytoplasm of some decidual cells and parietal trophoblast giant cells (TGC) were reactive with antibodies to erythropoietin and hepcidin-25 (a regulator of iron transport) at 10.5 gd (Supplemental Fig. 5). The proximity of these decidual cells to the hematopoietic foci may provide a specialized niche promoting

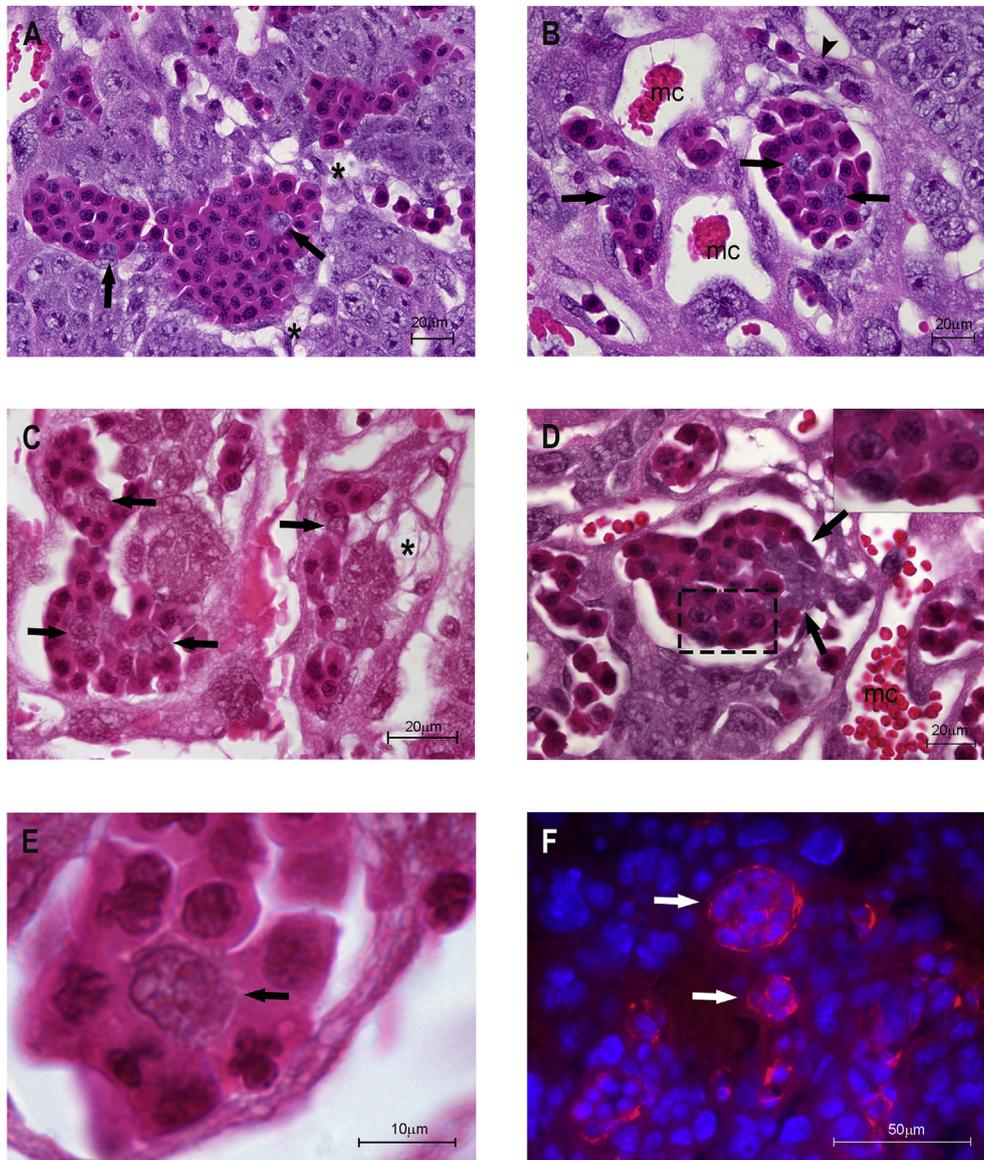


Fig. 3. Erythropoietic foci in the labyrinthine region near the junctional zone. (A–E) Clumps of tightly packed erythrocytes in different stages of differentiation formed the erythropoietic foci. In some areas, the presence of the endothelium surrounding these foci was not very distinct (**cluster in A**). The hematopoietic cells in such arrangements seemed to maintain connect to each other when clearly enclosed within fetal vessels and sometimes they seemed also to be attached to the adjacent vascular wall (**clusters in B–E**). The immature hematopoietic cells in erythropoietic foci were large cells whose nucleus occupied almost the entire cell and had one or two prominent nucleoli (**A–E: arrow**). Some immature cells with two prominent nucleoli had a cytoplasmic coloration indicative of hemoglobin possibly representing an erythroblast cell (**D: inset**). A reticulated mesh was organized in close proximity to some foci (**A, C: asterisks**). A large cell in mitosis is observed in **B (arrowhead)**. The placental labyrinth expressed vimentin in all endothelial cells (**F**). Some fetal erythrocytes also expressed vimentin in their cytoplasm (**F: arrows**). mc: maternal blood channels. **A–C, E, F:** 10.5 gd. **D:** 11.5 gd. Fluorescence microscopy: Red: Alexa Fluor-595; blue: DAPI.

localized placental erythropoiesis. Hepcidin-25 is also expressed by endodermal cells in yolk sac at 10.5 gd (data not shown).

3.4. Other immature hematopoietic cells are randomly distributed in the placental labyrinth

In addition to the chorionic plate region and junctional zone erythropoietic foci, a random pattern of occasional immature hematopoietic cells protruding towards vessel lumens was also observed on 10.5 and 11.5 gd but not on 9.5 or 12.5 gd. These diffusely spread cells protruded from narrow or cell wide areas of attachment to adjacent endothelium or trophoblast (**Fig. 6A–C**). Some of these budding cells were vWf+ (**Fig. 6D**); very few seemed to be committed to the erythroid lineage due to their cytoplasmic

color after H&E and Giemsa staining (data not shown).

Inside well defined fetal labyrinthine vessels, circulating immature cells (clusters or single cells) with peculiar nucleoli were also seen but only on 10.5 and 11.5 gd. (**Fig. 6E, F**). Some of the single cells were reactive with vWf (**Supplemental Fig. 6.A–D**) or for the immature hematopoietic cell markers CD41 (**Supplemental Fig. 6.E**) or Runx1 (**Supplemental Fig. 6.F**).

Some trophoblast cells morphologically resembled the immature hematopoietic cells because they had two prominent nucleoli and a less basophilic cytoplasm. Areas enriched with several trophoblast cells displaying this morphology could be found (**Fig. 6G, H**) sometimes loosely attached to each other. These cells appeared to transitioning towards a new morphology (**Fig. 6H**).

Other hematopoietic lineages such as myeloid, lymphoid or

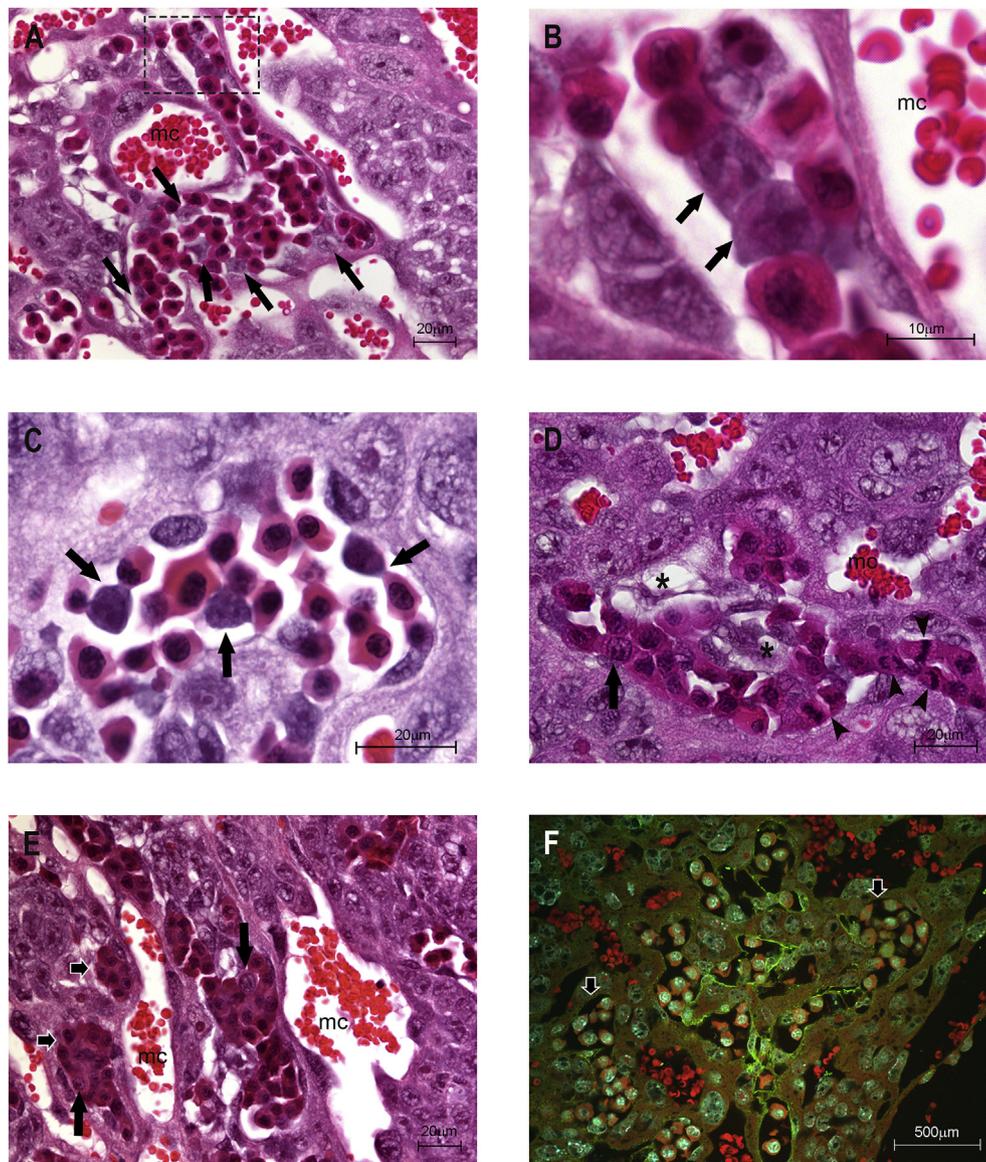


Fig. 4. Erythroid lineage cells in fetal vessels of labyrinthine placenta. Immature hematopoietic cells in loose arrangements with intermediate erythrocytes in circulation (**A–C: arrows**). Sometimes a link between two cells was clear (**C: arrows**). Some immature cells with two prominent nucleoli had a cytoplasmic coloration indicative of hemoglobin possibly representing an erythroblast cell (**C–E: arrow**). Mitotic figures were frequent in the intermediate erythrocytes (**D: arrowheads**). A reticulated mesh in close proximity to these arrangements was also observed (**D: asterisks**). Intermediate erythrocytes filled the fetal vessels where the presence of endothelium was not very distinct (**E: large arrow**). PNA lectin-stained endothelial cells in labyrinthine placenta (**F**). The absence of this lectin in some indicated a discontinuous endothelium (**F: large arrow**). mc: maternal blood channels. **A–C:** 11.5 gd. **D–F:** 10.5 gd. Confocal microscopy: Green: FITC; red: Evans's blue; blue: DAPI.

megakaryocyte cells as well as morphological evidences of erythroid enucleation were not observed in the placenta between 9.5 and 12.5 gd. Representative fluorescence background was not observed in the immunofluorescent data showed here (Supplemental Fig. 7).

4. Discussion

This is the first histological report to visualize the steps of blood cell formation in mouse placenta. We identified the simultaneous onset of hematopoiesis in two distinct placental regions that gave differing cell products during a very narrow window of gestation. Using histological, immunofluorescence and whole mount staining techniques, immature hematopoietic cells were identified *in situ* only at 10.5 and 11.5 gd and only in the placental labyrinth. We confirmed definitive hematopoietic induction at the chorionic plate where it has

been postulated that migrating allantoic mesenchymal cells contribute [24]. In addition, support was found for a novel erythropoietic niche in the labyrinthine area close to the junctional zone. Morphological evidence additionally supported close relationships between hematopoietic and endothelial cell origins in placenta.

Multiple microenvironmental niches produce hematopoietic cells during mammalian embryogenesis. In mouse embryos, nucleated erythrocytes, macrophages and megakaryocytes arise from yolk sac as early as 7.5 gd. These three cell lineages mature quickly, differ from counterparts produced later in gestation or during adult life and represent “primitive” yolk sac hematopoiesis. Primitive cells are thought to meet immediate needs of the developing fetus, such as oxygen demand and tissue remodeling prior to HSCs differentiation [5,6,30]. Primitive yolk sac erythrocytes have been considered to be the only circulating erythroid lineage cells until 12.5 gd, when definitive enucleated erythrocytes first appear

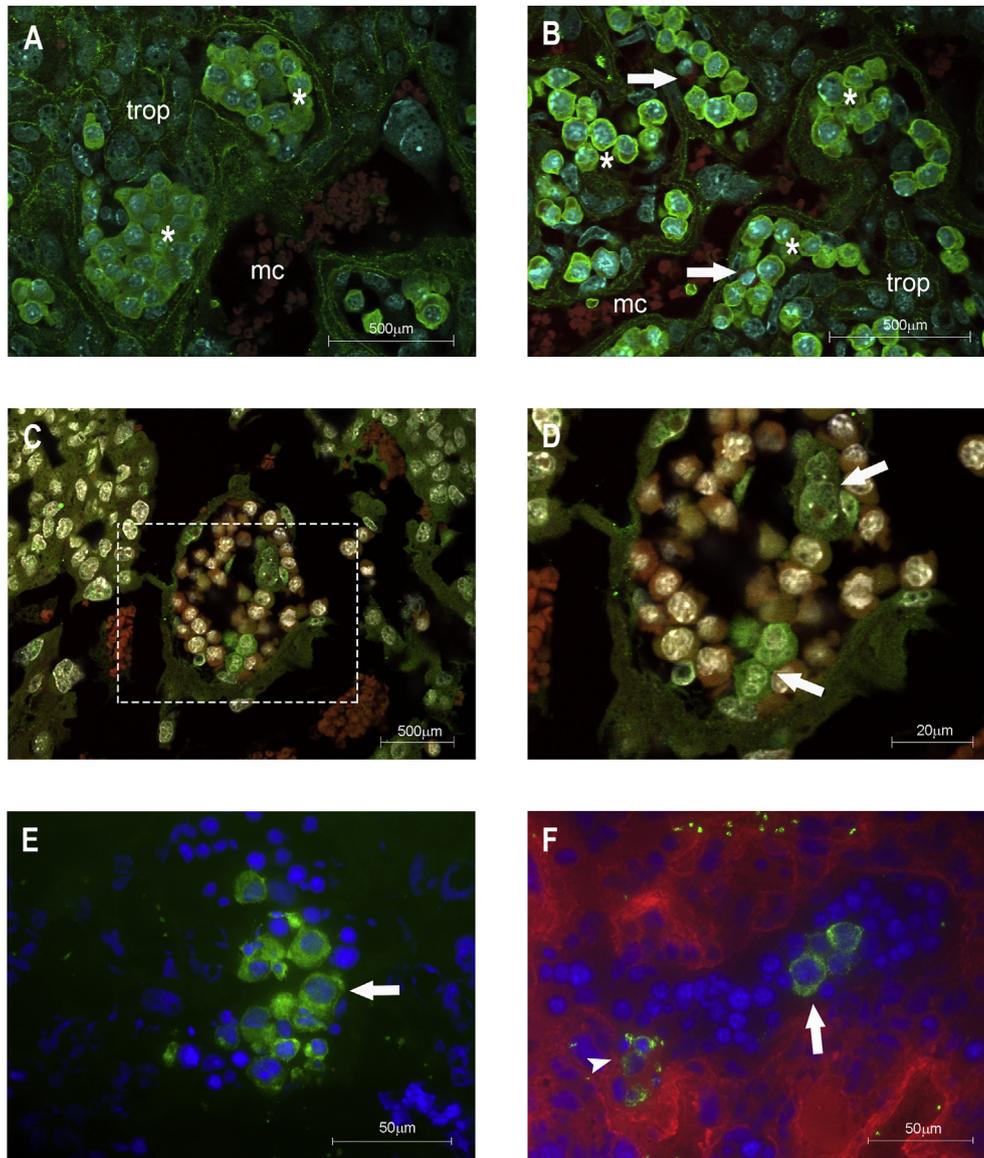


Fig. 5. Immunofluorescence characterization of cells in labyrinthine region close to junctional zone. (A, B) Tightly packed erythrocytes (asterisk) as well as trophoblast cells (trop) expressed surface cadherin. Some erythrocytes were cadherin negative (B: arrow). The immature cells within erythropoietic foci were positive for Sca1 (C, D: arrow), CD41 (E: arrow) or Von Willebrand factor (vWf) (F: arrow). Some clusters of cells vWf+ were in close contact with trophoblast (F: arrowhead). Immature hematopoietic cells are better observed in fig. D, which demonstrates the area limited by rectangle of the fig. C at a higher magnification. Differences in cell size, nuclear arrangement and in the ratio nucleus/cytoplasm of cells Sca1+, CD41+ and vWf+ indicated that they represent immature cells at different stages of maturation. mc: maternal blood channels. A, B: 11.5 gd. C–F: 10.5 gd. A–D: Confocal microscopy: Green: Alexa Fluor-488; red: Evans's blue; blue: DAPI. E–F: Fluorescence microscopy: Green: FITC (E) and Alexa Fluor-488 (F), red: Alexa Fluor 594, blue: DAPI.

in circulation [13,15,30]. Our studies identify a new potential erythropoietic niche in the placental labyrinth close to the junctional zone in addition to yolk sac. Placental erythropoietic foci were composed of immature hematopoietic cells attached to nucleated erythrocytes. They lacked the intermediate erythrocytic cell types typical of definitive hematopoiesis, appearing to mature quickly, a characteristic of primitive erythropoiesis. The presence of tightly and more loosely packed erythropoietic foci suggests that immature hematopoietic cells differentiate into erythroblasts *in situ* and then into erythrocytes, gradually losing adhesion molecule expression, possibly including cadherin, and entering the circulation. This configuration closely resembled yolk sac blood islands that appear as compact mesodermal cell masses before hemoangioblast differentiation into endothelium and circulating erythroblasts [5]. In contrast, in placenta, the erythropoietic foci consisted

in an intricate mass that included trophoblast islands. Additionally, the erythrocytes in the foci and in nearby vessels were frequently dividing compared with circulating nucleated erythrocytes in other labyrinthine vessels. These erythrocytes were more morphologically immature than yolk sac-derived erythrocytes. Yolk sac erythrocytes mature semi-synchronously and, at this developmental stage, no longer have evident nucleoli but have diminishing cross-sectional areas and diameters as the nucleus condenses prior to its extrusion [30]. The less mature appearance of the placental versus yolk sac erythroid cells and lack of a continuous endothelium surrounding some placental erythropoietic foci strongly support the hypothesis that placental erythropoietic foci arise *in situ* rather than by the seeding of circulating cells.

In conceptuses, definitive hematopoiesis follows primitive hematopoiesis and is closely associated with blood vessels [31–33]. In

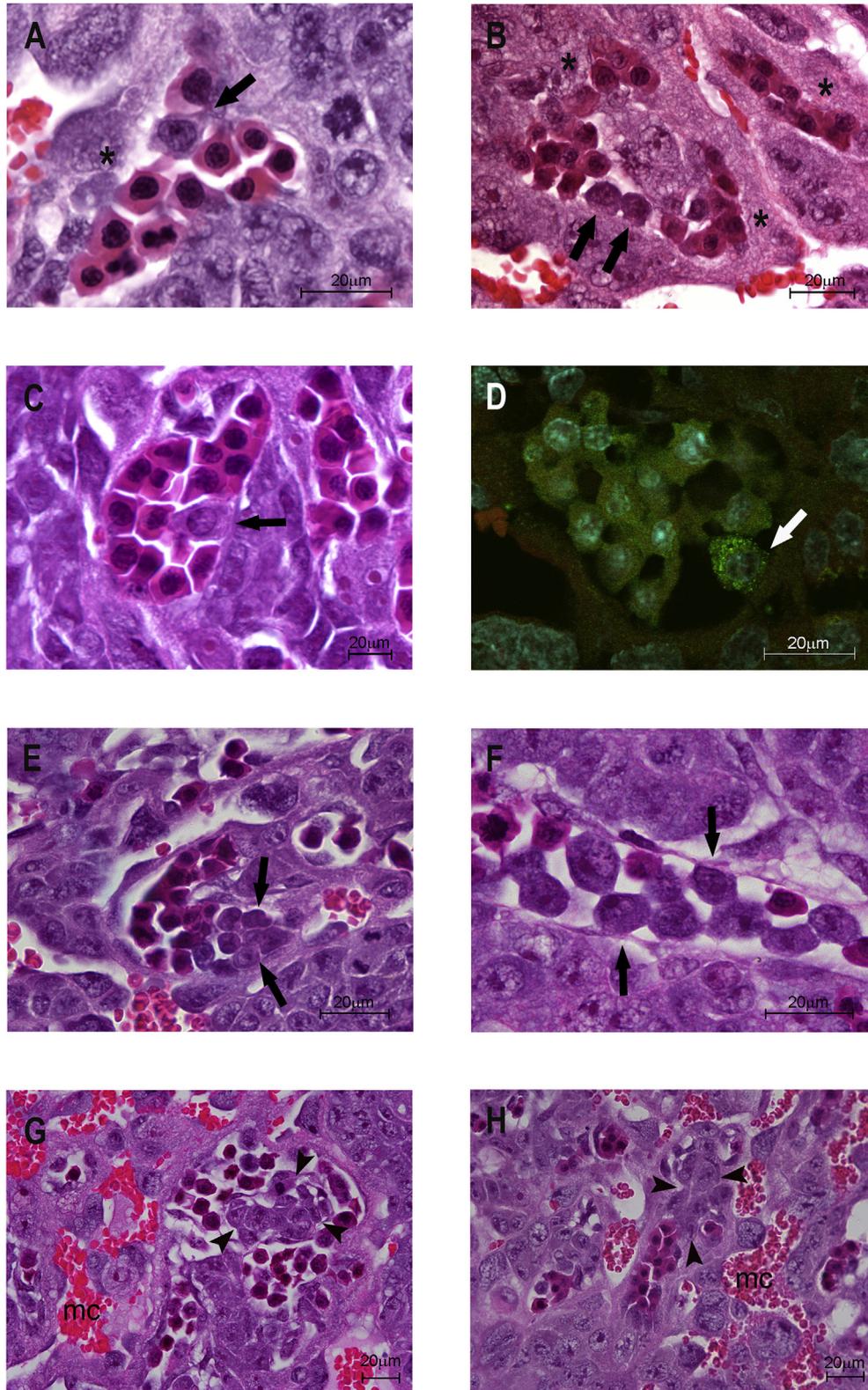


Fig. 6. Randomly distributed immature hematopoietic cells outside the two defined niches and their association with trophoblast cells in the placental labyrinth. (A–D) Hematopoietic cells protrusions into the lumen of fetal vessels (**arrow**). The budding cells exhibited a thin (**A**) or a wide (**B, C**) area of adherence to the adjacent endothelium or trophoblast. Budding cells were large, basophilic and had a large and central nucleus. Sometimes one or two prominent nucleoli were very noticeable. A cell budding into the fetal circulation was positive for von Willebrand factor (**D**). Endothelium surrounding blood cells was not detectable in some areas (**A, B**; **asterisk**). Groups of immature hematopoietic cells circulated inside fetal vessels of labyrinth (**E, F**; **arrows**). (**G, H**) Some trophoblast cells exhibited two prominent nucleoli (**arrowhead**). Some of trophoblast cells seemed to be weakly connected and slightly more basophilic than the surrounding trophoblast cells of labyrinth (**H**). mc: maternal blood channels. **A, F**: 11.5 gd. **B–E, G, H**: 10.5 gd. Confocal microscopy: Green: Alexa Fluor-488; red: Evans's blue; blue: DAPI.

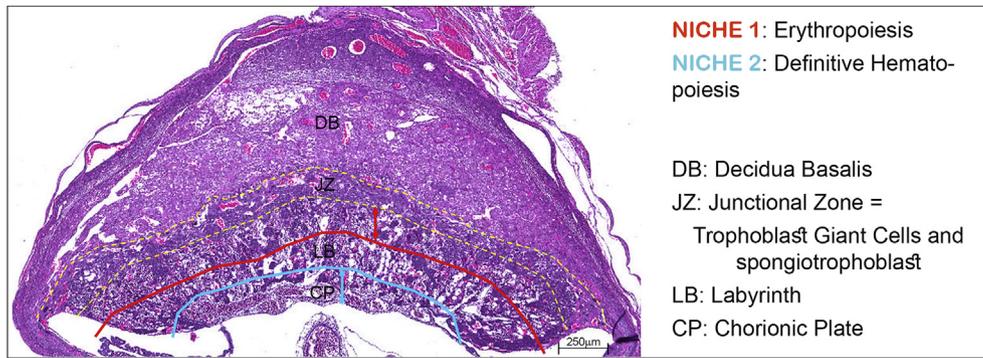


Fig. 7. Representation of the two potential major niches for hematopoiesis in mouse placenta at 10.5 gd. Niche one in red includes erythropoiesis in the labyrinthine region near the junctional zone. Niche 2 in blue includes the development of hematopoietic stem/progenitor cells of definitive hematopoiesis.

mice, yolk sac vessels produce short-term myelo-erythroid cells at 8.5 gd [7,34,35]. At 10.5 and 11.5 gd, long-term HSC are formed within large embryonic vessels such as dorsal aorta and in the vitelline and umbilical arteries. Blood vessels do not support proliferation and differentiation of HSCs; this occurs after HSC migration to fetal liver [7–11]. Mouse and human placentas also generate multipotent hematopoietic stem/progenitor cells [36] and it has been suggested that small vessels in the mouse placental labyrinth provide a suitable niche for HSC expansion without differentiation [23]. In our analysis, clusters morphologically similar to HSC were only observed in the labyrinthine region close to the chorionic plate. Since progenitors and putative HSC share surface marker expression [37], only our detailed morphological study has discriminated between these stages.

We observed immature hematopoietic cells randomly distributed in the placental labyrinth and protruding towards vessel lumens. We suspect that some of these are the progenitor cells for the erythropoietic foci due to their morphological similarities and expression of vWf. Similar cells were reported by our group in 17 gd surrounding mouse fetal liver portal veins in clusters with monocytes [13]. We suspect that the mouse placental progenitor cells would be able, under appropriate growth factor stimulation, to differentiate into other hematopoietic lineages. It will be important to establish if the clusters of circulating immature cells with peculiar nucleoli that we observed in placenta reach the fetal circulation and engraft the fetal liver. Interestingly, although erythropoietic foci in placenta are similar to the primitive erythropoiesis, EPO is required only for definitive hematopoiesis. EPO-dependent erythropoiesis was reported in placental vasculature at and after 13.5gd in mice lacking PDGF-B signaling [38].

Two potential major niches for hematopoietic cell development were identified in the labyrinth of 10.5 and 11.5 gd mouse placentas. In addition to producing hematopoietic stem/progenitor cells, placenta seems to produce an independent wave of primitive erythrocytes that may support the rapid, mid-pregnancy, fetal growth trajectory (Fig. 7). Recent studies revealed that adult macrophages came from distinct precursors formed by multiple waves of hematopoiesis during embryogenesis [39]. The overlap of hematopoietic waves makes fate mapping difficult but it will be clinically important to establish whether progeny from the placental cell lineages contribute to postnatal hematopoiesis. IHC suggested close relationships between hematopoietic and endothelial cells within placenta. vWf expression in hematopoietic cells raises the question of whether these placental precursors differentiate from homogenic endothelium as documented for definitive hematopoiesis. Alternatively, a bipotential precursor may give rise to hematopoietic and endothelial cells that will generate new vessels to join to the vascular network extending from the

chorionic plate. A similar mechanism has been proposed for human placentas [17]. Juxtaposition and morphological similarity was also found between immature cells of hematopoietic foci and some trophoblast cells within the labyrinth under light microscopy. Relationships between these cells at the ultrastructural level and in their origins merits further investigation. Others are exploring the use of erythrocytes derived from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells for blood transfusions products [40]. Characterization of trophoblast HSC progenitor cells and the molecular mechanisms that promote their differentiation along an erythrocytic pathway are exciting complementary approaches for this clinical application.

Conflict of interest statement

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Funding

Supported by awards from Brazilian Council for Scientific and Technological Development/CNPq and CAPES (NAP); CNPq (311132/2006-5), Faperj (E-26/103.267/2011), and Fiocruz grants (MPM); NSERC (RGPIN/3219-2011) and the Canada Research Chairs Program (BAC).

Acknowledgements

The authors would like to thank Luciana Silva Souza, Luzia Helena Pereira Barros, Dr. Pedro Paulo Manso (Fiocruz) and Luzia Caputo for their technical histological assistance; Iolanda Souza for animal care assistance; Igor Silva for microscopy technical assistance; and Oscar Gamo for the VSlide imaging automation platform (Metasystems, Germany) used for slide scanning.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.081>.

References

- [1] A. Ciau-Uitz, R. Monteiro, A. Kirmizitas, R. Patient, Developmental hematopoiesis: ontogeny, genetic programming and conservation, *Exp. Hematol.* 42 (2014) 669–683.
- [2] J. Tober, A. Koniski, K.E. McGrath, R. Vemishetti, R. Emerson, K.K.L. De Mesy-Bentley, et al., The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis, *Blood* 109 (2007) 1433–1441.
- [3] J.Y. Bertrand, A. Jalil, M. Klaine, S. Jung, A. Cumano, I. Godin, Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac, *Blood* 106 (2005)

- 3004–3011.
- [4] I. Godin, A. Cumano, The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 593–604.
- [5] J. Palis, M.C. Yoder, Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man, *Exp. Hematol.* 29 (2001) 927–936.
- [6] E. Dzierzak, S. Philipsen, Erythropoiesis: development and differentiation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3 (2013) a011601.
- [7] J.M. Frame, K.E. McGrath, J. Palis, Erythro-myeloid progenitors: “definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells, *Blood Cells Mol. Dis.* 51 (2013) 220–225.
- [8] F. Dieterlen-Lièvre, On the origin of hematopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33 (1975) 607–619.
- [9] S. Gordon-Keylock, M. Sobiesiak, S. Rybtsov, K. Moore, A. Medvinsky, Mouse extraembryonic arterial vessels harbor precursors capable of maturing into definitive HSCs, *Blood* 122 (2013) 2338–2345.
- [10] T. Yokomizo, E. Dzierzak, Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos, *Development* 137 (2010) 3651–3661.
- [11] T. Yokomizo, C.E.L. Ng, M. Osato, E. Dzierzak, Three-dimensional imaging of whole midgestation murine embryos shows an intravascular localization for all hematopoietic clusters, *Blood* 117 (2011) 6132–6134.
- [12] H.K.A. Mikkola, C. Gekas, S.H. Orkin, F. Dieterlen-Lievre, Placenta as a site for hematopoietic stem cell development, *Exp. Hematol.* 33 (2005) 1048–1054.
- [13] J.D.P. Ayres-Silva, P.P.D.A. Manso, M.R.D.C. Madeira, M. Pelajo-Machado, H.L. Lenzi, Sequential morphological characteristics of murine fetal liver hematopoietic microenvironment in Swiss Webster mice, *Cell Tissue Res.* 344 (2011) 455–469.
- [14] J. Ciriza, H. Thompson, R. Petrosian, J.O. Manilay, M.E. García-Ojeda, The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: lessons learned and possible clinical applications, *Exp. Hematol.* 41 (2013) 411–423.
- [15] D. Sugiyama, T. Inoue-Yokoo, S.T. Fraser, K. Kulkeaw, C. Mizuochi, Y. Horio, Embryonic regulation of the mouse hematopoietic niche, *Sci. World J.* 11 (2011) 1770–1780.
- [16] J.C. Challier, M. Galtier, A. Cortez, T. Bintein, M. Rabreau, S. Uzan, Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta, *Placenta* 26 (2005) 282–288.
- [17] J.D. Aplin, H. Whittaker, Y.T.J. Lim, S. Swietlik, J. Charnock, C.J.P. Jones, Hemangioblastic foci in human first trimester placenta: distribution and gestational profile, *Placenta* 36 (10) (2015) 1069–1077.
- [18] C. Robin, K. Bollerot, S. Mendes, E. Haak, M. Crisan, F. Cerisoli, et al., Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development, *Cell Stem Cell.* 5 (2009) 385–395.
- [19] A. Bárcena, M.O. Muench, C. Kapidzic, S.J. Fisher, A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation, *Reprod. Sci.* 16 (2) (2009) 178–187.
- [20] M. Alvarez-Silva, P. Belo-Diabangouaya, J. Salaün, F. Dieterlen-Lièvre, Mouse placenta is a major hematopoietic organ, *Development* 130 (22) (2003) 5437–5444.
- [21] C. Gekas, F. Dieterlen-Lièvre, S.H. Orkin, H.K.A. Mikkola, The placenta is a niche for hematopoietic stem cells, *Dev. Cell.* 8 (2005) 365–375.
- [22] K. Ottersbach, E. Dzierzak, The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region, *Dev. Cell.* 8 (2005) 377–387.
- [23] K.E. Rhodes, C. Gekas, Y. Wang, C. Lux, C.S. Francis, D.N. Chan, et al., The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation, *Cell Stem Cell.* 2 (3) (2008) 252–263.
- [24] T. Sasaki, C. Mizuochi, Y. Horio, K. Nakao, K. Akashi, D. Sugiyama, Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse, *Development* 137 (2010) 3941–3952.
- [25] J. Rossant, J.C. Cross, Placental development: lessons from mouse mutants, *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001) 538–548.
- [26] B.A. Croy, A.T. Yamada, F.J. DeMayo, S.L. Adamson (Eds.), *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, Academic Press, United States of America, 2014, p. 808.
- [27] B.M. Zeigler, D. Sugiyama, M. Chen, Y. Guo, K.M. Downs, N.A. Speck, The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential, *Development* 133 (2006) 4183–4192.
- [28] C. Corbel, J. Salaün, P. Belo-Diabangouaya, F. Dieterlen-Lièvre, Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois, *Dev. Biol.* 301 (2007) 478–488.
- [29] F.L. Carson, J.H. Martin, J.A. Lynn, Formalin fixation for electron microscopy: a reevaluation, *Am. J. Clin. Pathol.* 59 (1973) 365–373.
- [30] S.T. Fraser, J. Isern, M.H. Baron, Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell surface antigen expression, *Blood* 109 (2007) 343–352.
- [31] A. Cumano, I. Godin, Ontogeny of the hematopoietic system, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 745–785.
- [32] T. Jaffredo, R. Gautier, A. Eichmann, F. Dieterlen-Lièvre, Intra-aortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny, *Development* 125 (1998) 4575–4583.
- [33] J.C. Boisset, W. van Cappellen, C. Andrieu-Soler, N. Galijart, E. Dzierzak, C. Robin, In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium, *Nature* 464 (2010) 116–120.
- [34] K.E. McGrath, J. Palis, Hematopoiesis in the Yolk sac: more than meets the eye, *Exp. Hematol.* 33 (2005) 1021–1028.
- [35] P. Kaimakis, M. Crisan, E. Dzierzak, The biochemistry of hematopoietic stem cell development, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2) (2012) 2395–2403.
- [36] K. Ottersbach, E. Dzierzak, The placenta as a haematopoietic organ, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 1099–1106.
- [37] K.E. McGrath, J.M. Frame, K.H. Fegan, J.R. Bowen, S.J. Conway, S.C. Catherman, et al., Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo, *Cell Rep.* 11 (12) (2015) 1892–1904.
- [38] A. Chhabra, A.J. Lechner, M. Ueno, A. Acharya, B.V. Handel, Y. Wang, M.L. Iruela-Arispe, M.D. Tallquist, H.K.A. Mikkola, Trophoblasts regulate the placental hematopoietic niche through PDGF-B signaling, *Dev. Cell.* 22 (3) (2012) 651–659.
- [39] F. Ginhoux, M. Guilliams, Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis, *Immunity* 44 (2016) 439–449.
- [40] A. Fujita, N. Uchida, J.J. Haro-Mora, T. Winkler, J. Tisdale, β -globin-expressing definitive erythroid progenitor cells generated from embryonic and induced pluripotent stem cell-derived sacs, *Stem Cells* 34 (6) (2016 Jun) 1541–1552.

The Transcription Factor NFIL3 Is Essential for Normal Placental and Embryonic Development but Not for Uterine Natural Killer (UNK) Cell Differentiation in Mice¹

Mackenzie L. Redhead, Nathália A. Portilho, Allison M. Felker, Shuhiba Mohammad, Danielle L. Mara, and B. Anne Croy²

Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

ABSTRACT

Mice ablated for the gene encoding the transcription factor *Nfil3* lack peripheral natural killer (NK) cells but retain tissue-resident NK cells, particularly in mucosal sites, including virgin uterus. We undertook a time course histological study of implantation sites from syngeneically (*Nfil3*^{-/-}) and allogeneically (BALB/c) mated *Nfil3*^{-/-} females. We also examined implantation sites from *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} females preconditioned by adoptive transfer of *Nfil3*^{-/-} marrow or uterine cell suspensions to identify the *Nfil3*^{-/-} pregnancy aberrations that could be attributed to nonlymphoid cells. Uterine NKs (UNKs) reactive and nonreactive with the lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) differentiate, localize, and mature within *Nfil3*^{-/-} implantation sites, although at reduced abundance. The DBA nonreactive UNK cells were enriched following *Nfil3*^{-/-} marrow transplantation. Uterine lumen closure, early embryonic development, and differentiation of antimesometrial decidua were delayed in *Nfil3*^{-/-} implantation sites. Major disturbances to the decidual-trophoblast interface that did not lead to fetal death were attributed to NFIL3 deficiency in trophoblast. At midgestation, vessels of the placental labyrinth were enlarged, suggestive of reduced branching morphogenesis. A major term complication in most *Nfil3*^{-/-} × *Nfil3*^{-/-} pregnancies but not *Nfil3*^{-/-} × *Nfil3*^{+/-} pregnancies was dystocia. These studies highlight the differentiation potential and functions of *Nfil3*^{-/-} UNK cell progenitors and illustrate that much of the implantation site histopathology associated with this strain is due to *Nfil3* deletion in nonlymphoid cell lineages.

decidua, fetal growth retardation, hematopoietic cell transplantation, spiral arterial modification, trophoblast

INTRODUCTION

In species with hemochorial placentation, development of decidua basalis (DB) is accompanied by a leukocyte influx into the implantation site. Between Gestation Day (GD) 5 and midpregnancy (GD 12.5), this influx is dominated by innate lymphoid cells currently called uterine natural killer (UNK) cells. Mice have at least two distinct UNK cell subsets. One

subset is identified as NK1.1⁺DX5⁺ by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting) [1] or as periodic acid-Schiff (PAS)-positive, *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)-negative (PAS⁺DBA⁻) by lectin histochemistry. These cells resemble peripheral NK cells and are the source of interferon gamma (IFNG), which is implicated in UNK cell-initiated maternal spiral arterial remodeling [2, 3]. NK1.1⁺DX5⁺/PAS⁺DBA⁻ UNK cells represent 50% of all UNK cells at GD 6.5 but only 10% by GD 10.5 [2, 4]. Another UNK cell population is defined as NK1.1⁻DX5⁻ by fluorescence-activated cell sorting and as PAS⁺DBA⁺ by lectin histochemistry [1, 5]. Transcript analyses of these cells that rapidly become the dominant UNK cells in DB suggest this population is strongly biased toward angiokine production (VEGF [6], PGF [7], and others). Adoptive transfer of normal bone marrow into mice lacking lymphocytes differentiates only PAS⁺DBA⁺ UNK cells. Uterine NK cells of early decidua are small, agranular cells [4] that proliferate rapidly in DB and, after GD 8.5, in the newly developed, transient uterine wall structure called the mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp). Uterine NK cells enlarge in diameter and their cytoplasm becomes filled with granules to GD 12.5, and then nuclei fragment and UNK cell numbers decline gradually to term [4, 8].

Contributions of UNK cells to pregnancy have been deduced from studies of implantation sites in a number of different immune-deficient mice [9–12]. Key understanding was provided by comparisons between alymphoid *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} (NK⁻T⁻B⁻), *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} engrafted by hematopoietic tissue from SCID or *Rag2*^{+/-} donors (NK⁺T⁺B⁻), and normal mice (NK⁺T⁺B⁺). Deficient early decidual angiogenesis, delayed early embryonic development, and failure of spiral arterial modification at midgestation were observed in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} implantation sites and normalized when females were preconditioned with NK⁺T⁺B⁻ grafts before mating [9]. This approach, however, lacks assessment of the isolated impact of an NK cell deficiency when contributions of T and B cells are sustained. The first NK-cell-deficient but T- and B-cell-competent (NK⁻T⁺B⁺) mice were reported from two laboratories in 2009 resulting from ablation of the gene encoding the transcription factor nuclear factor IL3 (NFIL3 [13]; also known as E4BP4 [14]). NFIL3 is a ubiquitously expressed basic leucine zipper transcription factor that plays roles in circadian rhythm, ovulation, and the development of specific immune cells [13, 15–21]. *Nfil3*^{-/-} mice have normal numbers of T, B, and NKT cells in blood, spleen, liver, lung, and bone marrow (BM) [14, 17] but lack NK cells in thymus, BM, spleen, liver, and lung. These deficits are attributed to compromised NK cell progenitors rather than to microenvironmental effects [13, 22]. *Nfil3*^{-/-} mice also display altered cytokine production in CD4⁺ T cells, deficient immunoglobulin E (IgE) production in B cells, and greatly reduced numbers of CD8α⁺ conventional dendritic cells in spleen and thymus

¹Supported by awards from Queen's University to M.L.R. and A.M.F., including the Robert Sutherland Fellowship to M.L.R.; CAPES to N.A.P.; and NSERC, CIHR, CFI, and the Canada Research Chairs Program to B.A.C.

²Correspondence: B. Anne Croy, Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada. E-mail: croya@queensu.ca

Received: 10 January 2016.
First decision: 8 February 2016.
Accepted: 10 March 2016.

© 2016 by the Society for the Study of Reproduction, Inc. This article is available under a Creative Commons License 4.0 (Attribution-Non-Commercial), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>
ISSN: 0006-3363