

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**

**JOSÉ RONALDO ALVES DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES**  
**INDIFERENCIADAS DO SACO VITELINO DE RATAS**  
**WISTAR DIABÉTICAS**

**ARACAJU - SE**

**2013**

**JOSÉ RONALDO ALVES DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES  
INDIFERENCIADAS DO SACO VITELINO DE RATAS WISTAR  
DIABÉTICAS.**

Dissertação de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto - UFS

**ARACAJU – SE**

**2013**

**JOSÉ RONALDO ALVES DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES  
INDIFERENCIADAS DO SACO VITELINO DE RATAS  
WISTAR DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto**

---

**1º Examinador: Prof. Dr<sup>a</sup> Shirlei Octacílio da Silva**

---

**2º Examinador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**

**PARECER**

---

---

---

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237c Santos, José Ronaldo Alves dos  
Caracterização de células pluripotentes indiferenciadas do saco vitelino de ratas wistar diabéticas / José Ronaldo Alves dos Santos ; orientador Emerson Ticona Fioretto. – Aracaju, 2013.  
54 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Diabetes. 2. Células-tronco. 3. Saco vitelino. 4. Gravidez. I. I. Fioretto, Emerson Ticona, orient. II. Título.

CDU 616.379-008.64:602.9:591.81

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta etapa vitoriosa da minha vida a Deus, por me tornar apto à obter novos conhecimentos, por me dar forças para continuar seguindo meu caminho pelo lado bom da fé e da coragem, por ser fonte infinita de sabedoria em que pude me amparar nos momentos mais difíceis. E a minha querida irmã Janaina Alves por sempre acreditar e torcer por mim. A você meu muito obrigado pelo carinho e apoio.

“Como diz Gandhi, as pessoas poderão duvidar daquilo que você diz, mas acreditarão naquilo que você faz”.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me auxiliar nesta conquista e por me permitir a realização desta dissertação.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Durvanei Augusto Maria, pela acolhida em seu laboratório para realização de grande parte deste trabalho, peço-lhe desculpas pela correria mais agradeço-lhe infinitamente pela grande ajuda a mim dispensado nestes últimos meses. Levarei pelo resto da minha vida, as características profissionais que percebi e aprendi. Agradeço imensamente pela oportunidade fantástica de aprender e vivenciar no âmbito de seu laboratório. Meu querido Amigo muito obrigado.

À minha querida Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marlúcia Bastos Aires, agradeço por me apoiar, incentivar, cobrar e investir na construção deste trabalho. Sem sua ajuda nada teria sido concretizado.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Queiroz Gurgel, Coordenador do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe e a todos os professores pelo apoio e contribuição de vocês.

À minha querida Karine Santos Souza, por participar deste sonho desde começo, por vivenciar as dificuldades comigo e me encorajar, pelos inúmeros ensinamentos, explicações, auxílio nos experimentos, pela grandiosa amizade e auxílio na confecção desta dissertação.

Ao meu Amigo de coração Francisco Albuquerque Klank. Sua amizade é um bem muito precioso que quero preservar para o resto da minha vida. Obrigado pelo apoio e ajuda na confecção deste trabalho.

À todos os membros da banca de qualificação e de defesa pelo auxílio, sugestões e críticas que me auxiliaram na busca por este título.

À todos os animais do laboratório que contribuíram para a minha pesquisa. Vocês salvam muitas vidas.

À todos os funcionários, técnicos e companheiros do Instituto Butantan - SP.

Agradeço a Capes, pelo apoio e financiamento deste projeto.

Um abraço especial aos meus amigos na Suíça Thimotheus Sonnenschein ao meu querido amigo em Paderbon Rainer e minha querida Maria Rissmann em Trier pela preocupação constante comigo e orações a mim constantemente enviadas. Iher Seid in meinem Herzen Zu Ewigkeit.

À todos os meus amigos do NPGME, Laboratório de Morfologia -UFS e do Instituto Butanta não citarei nome pois são inúmeros, obrigado pela amizade e companheirismo. O valor de uma amizade é superior a qualquer preço.

Com a ajuda de todos vocês eu realizei esse sonho.

Muito obrigado!

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Ao Profº Drº Emerson Ticona Fioretto**

É um dever meu destacar um agradecimento mais que especial, a você meu orientador e amigo. Só Deus sabe o que passamos para chegarmos aqui. E você com sua paciência, seu senso de humor nunca permitiu que as dificuldades nos desviassem da direção. Obrigado pelo apoio nos momentos difíceis. Quero pedir-te desculpas pelas minhas limitações. Eu tenho muito a te agradecer, desde minha vinda do Paraná, demonstrastes que acreditavas em mim, esses anos de trabalho juntos só me fez te admirar e respeitar mais e mais. Obrigado pelos ensinamentos, dedicação e orientação no decorrer do mestrado.

Essa frase te define: “Um verdadeiro amigo é alguém que te conhece tal como és, compreende onde tens estado, acompanha-te em teus lucros e teus fracassos, celebra tuas alegrias, compartilha tua dor e jamais o julga por seus erros”.

Todo bom começo tem um bom PROFESSOR.

**“Tens o dom de ver estrada quando eu vejo o fim, me convences quando falas não é bem assim, se me esqueço me recordas, se não sei me ensinas e se perco a direção vens me encontrar”**

**Muito obrigado Fioretto**

## RESUMO

SANTOS, J. R.A. Caracterização de células pluripotentes indiferenciadas do saco vitelino de ratas wistar diabéticas, Núcleo de Pós-graduação em Medicina, Mestrado em ciência da Saúde – NPGME/UFS, 54p, 2013.

**Introdução:** A terapia com células-tronco tem sido aplicada como coadjuvante no tratamento para algumas doenças ou distúrbios. Uma variedade de células pluripotentes têm sido investigadas essas células podem ser encontradas na placenta, cordão umbilical, polpa de dentes. No entanto o comportamento de células pluripotentes submetido a um distúrbio fisiológico concomitante como diabetes não foi totalmente compreendido. **Métodos:** O objetivo foi avaliar o potencial de proliferação, e a caracterização de marcadores de células-tronco para diferenciação potencial celular, atividade mitocondrial, ciclo celular e apoptose das células-tronco do saco vitelino obtidos de ratas em 15 e 20 gd em condições normais e hiperglicêmicos usando a citometria de fluxo para analisar as fases do ciclo celular, o potencial da membrana mitocondrial, a expressão de Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4, CD117, CD115, CD 44, CD34, de VEGF-R1, a COX-2, a MCP-1, IFN- $\gamma$  R1, L 1 e a caspase-3. **Resultados:** Nos grupos diabéticos observou-se elevados níveis de inatividade mitocondrial, diminuindo intensamente em fase G2 / M, sobre a expressão de caspase, diminuição da expressão dos marcadores formadores de adesão como CD 44, CD 34, e NANOG. Aumento da Pluripotencia dos receptores CD 90, VEGF-R1, TNF-R1, IL-1, COX-2, Caspase **Discussão:** No último período de diabetes gestacional pode estar associado à desregulamentação permeabilidade, integridade mitocondrial, liberação de citocromo c, redução da progressão do ciclo celular, ativação da apoptose e diminuição da capacidade proliferativa. **Conclusão:** Diabetes parece ter uma influência negativa sobre o comportamento das células do saco vitelino nos último período de gestação.

**Descritores:** Diabetes, células-tronco, saco vitelino, Desenvolvimento embrionário em gestação.

## ABSTRACT

SANTOS, J. R. A. Characterization undifferentiated pluripotent cells of the yolk sac of diabetic rats wistar. Center for Postgraduate Medicine, Master of Health Science - NPGME / UFS, 54p, 2013

**Introduction:** Stem cell therapy has been applied as coadjuvant or treatment for some diseases or disorders. A range of sources of pluripotent cells have been investigated as placental, umbilical cord, teeth pulp, fat. However pluripotent cell behavior submitted to a concomitant physiological disorder as diabetes has been no fully understood. **Methods:** We aimed to evaluate proliferative potential, and the characterization of stem cells markers for potential cell differentiation, mitochondrial activity, cell cycle and apoptosis in samples of stem cells from yolk sacs obtained from rats in 15 and 20 gd in normal and hyperglycemic conditions using flow cytometry to analyze cell cycle stages, mitochondrial membrane potential, expression of Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4, CD117, CD115, CD 44, CD34, VEGF-R1, COX-2, MCP-1, INF- $\gamma$  R1, L 1 and phosphorylated Caspase-3. **Results:** In diabetic groups we observed high levels of mitochondrial inactivity, intensively decreasing in G2/M phase, over expression of caspase, decreased expression of adhesion formation markers such as CD 44, CD 34, and NANOG. Increased pluripotency CD 90 receptor, VEGF-R1, TNF-R1, IL-1, COX-2, Caspase. **Discussion:** In the last period of gestation diabetes might be associated to permeability deregulation, mitochondrial integrity, cytochrome c release, reduction in the cell cycle progression, apoptosis activation and proliferative capacity decreasing. **Conclusion:** Diabetes seems to play a negative influence on yolk sac cell behavior in the last period of gestation.

**Descriptors:** Diabetes, Stem Cell, Yolk sac, Embryonic Development, Gestation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos o potencial elétrico mitocondrial.....	34
<b>Tabela 2:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos as fases do ciclo celular em células do saco vitelino.....	35
<b>Tabela 3:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos a proporção e distribuição do DNA/célula e a ploidia das células do saco vitelino. ....	36
<b>Tabela 4:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e diabéticas células do saco vitelino.....	37
<b>Tabela 5:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino. ....	39
<b>Tabela 6:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino .....	41
<b>Tabela 7:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino. ....	42
<b>Tabela 8:</b> Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Expressão da atividade mitocondrial em células do saco vitelino. ....	35
<b>Figura 2:</b> Análises das fases do ciclo celular das células do saco vitelino. ....	35
<b>Figura 3:</b> Análise da proporção e distribuição do DNA/célula e a Ploidia das células do Saco Vitelino. ....	36
<b>Figura 4:</b> Expressão dos marcadores envolvidos na migração celular determinados por citometria de fluxo .....	37
<b>Figura 5:</b> Expressão dos marcadores envolvidos na formação dos vasos e potencial hematopoiético grupo Controle e Diabético determinados por citometria de fluxo .....	40
<b>Figura 6:</b> Expressão dos Marcadores envolvidos na origem e pluripotência das células – tronco Controle e Diabético determinados por citometria de fluxo .....	41
<b>Figura 7:</b> Expressão dos marcadores receptores envolvidos na inflamação e proliferação celular Grupo Controle e Diabético determinados por citometria de fluxo.....	42
<b>Figura 8:</b> Expressão dos marcadores envolvidos na morte celular dos Grupos Controle e Diabético determinados por citometria de fluxo. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** -Análise de variância

**BSA** - Albumina de Soro bovino (do inglês Bovine Serum Albumin)

**CASPASE** - Caspase marcador de indução de morte celular.

**CD 117** - Receptor C-kit expressada em superfície de células progenitoras hematopoiéticas, células tímicas e hepatócitos.

**CD 34** - Reage com células progenitoras hematopoiéticas, e endoteliais da medula óssea.

**CD 44** - proteína de superfície celular envolvida com as interações celulares, adesão celular e migração. Expressa em células hematopoiéticas, não hematopoiéticas, células epiteliais e em baixos níveis de leucócitos.

**CD 90** -Antígeno de superfície celular Thy-1. Pode ser utilizada como marcador para variedades de tipos de células-tronco e para neurônios maduros.

**c-KIT**- mesmo que CD 117 do inglês cytokine receptor.

**CO2** - Dióxido de Carbono

**COX-2** - Ciclo -oxigenase -2

**CTE** - Célula tronco embrionária.

**Dg** - dias de gestação.

**DMSO** - Dimetil Sulfóxido

**FACS** – Fluorescente de atividade celular.

**FBS** - Soro Bovino Fetal

**FITC**- Isotioclanato de fluoresceína

**IL – 1**- Interleucina

**mRNA** - RNA mensageiro.

**NANOG** - Determinante de células-tronco embrionárias e germinativas são fatores de transcrição envolvidos na regulação da suspensão de genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência.

**OCT 3/4** - do inglês octamer 4 fator de transcrição de células-tronco embrionária e germinativas pluripotentes.

**PI** – Iodeto de propídeo.

**RPM** – Rotação por minuto

**STROL -1** – do inglês stromal cell surface antigen 1.

**TNF –R1**- receptor de TNF

**VEGF –R1**- do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor – Fator de crescimento do endotélio.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FORMAÇÃO DO SACO VITELINO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 Relações Morfofuncionais do Saco Vitelino.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3 Aspectos macroscópicos e microscópicos do saco vitelino em diferentes espécies .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.4 Função do saco vitelino.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 CÉLULAS-TRONCO.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 FASES DO CICLO CELULAR .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 MARCADORES DE MORTE CELULAR E APOPTOSE.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO E DIFERENCIAÇÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 DIABETES.....</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Animais e procedimento experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.3 Coleta das Amostras de Saco Vitelino e obtenção das Células Pluripotentes de Saco Vitelino .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.4 Análises das Fases do Ciclo nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.5 Análises do Potencial Metabólico da Membrana Mitocondrial Sonda Rodamina 123 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo. ....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.6 Expressão de marcadores de maturação, diferenciação de células-tronco. Os marcadores utilizados foram: Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4, CD117, CD115, CD 44, CD34, VEGF-R1, COX-2, MCP -1, INF-<math>\gamma</math> R1, 1 L-1F e a Caspase 3 - fosforilada. ....</b>	<b>34</b>
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>35</b>
<b>6 RESULTADO.....</b>	<b>35</b>

6.1 EXPRESSÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DO SACO VITELINO.....	35
6.2 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO.....	37
6.3 ANÁLISE DA PROPORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO DNA/CÉLULA E A PLOIDIA DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO.....	38
6.4 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO CELULAR DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
6.5 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DOS VASOS E POTENCIAL HEMATOPOIÉTICO GRUPO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	41
6.6 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA ORIGEM E PLURIPOTÊNCIA DAS CÉLULAS – TRONCO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
6.7 EXPRESSÃO DOS MARCADORES RECEPTORES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR GRUPO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
6.8 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA MORTE CELULAR DOS GRUPOS CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
7.1 ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	49
7.2 CASPASE.....	50
7.3 CICLO CELULAR E PLOIDIA.....	51
7.4 MARCADORES.....	53
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As células tronco podem ser classificadas quanto a sua origem em células tronco embrionárias, fetais ou adultas, caracteristicamente apresentam capacidade em se diferenciar em células especializadas formando os tecidos, além de células-filhas idênticas às células-mãe, conferindo-lhes auto-renovação. (WENCESLAU, 2009).

Essas células, devido a sua característica de potencialidade em formar células especializadas, têm-se mostrado bastante promissora no tratamento dos agravos a saúde como a recuperação de tecido neurológico (doença de Parkinson, lesão da medula espinal), tecido endócrino do pâncreas (diabetes), células musculares e vasos cardíacos (insuficiência cardíaca, IAM) (CAPLAN, 1991; HOCHEREAU-DE REVIERS, 1993; GEARHART et al., 1998 COVAS; ZAGO, 2004; GJORRET, 2005; PERREIRA, 2008).

O saco vitelino é um anexo embrionário considerado uma fonte promissora de células pluripotentes por possuir populações progenitoras de células hematopoiéticas e mesenquimais, ambas as populações importantes para o desenvolvimento placentário, embrionário e fetal. Acrescenta-se ainda que esta fonte de células ainda é pouco explorada (WENCESLAU, 2009).

O diabetes é uma doença que interfere no metabolismo celular. Refere-se ainda que no período gestacional embrionário possa acarretar em distúrbios metabólicos na proliferação endotelial e no crescimento vascular de diversos tecidos comprometendo o desenvolvimento embrionário (MAYHEW et al., 2004; PERES et al., 2009).

A investigação dos fatores desencadeados pelo diabetes pode ser relacionada às alterações que podem acontecer no metabolismo celular do saco vitelino, durante o desenvolvimento embrionário. Não obstante, a caracterização dos mecanismos envolvidos na proliferação e morte celular pode contribuir para o melhor entendimento dos fatores de morbidade e mortalidade dos recém-nascidos de gestantes diabéticas. Adicionalmente, a utilização terapêutica de células tronco embrionárias permanecem controversas quanto à eficácia do auto-transplante em pacientes acometidos por doenças sistêmicas como no caso do diabetes.

Desta forma o presente trabalho buscou avaliar os potenciais proliferativo, energético mitocondrial, e de diferenciação celular pela expressão de marcadores celulares, além de analisar o perfil do ciclo celular e de ploidia de células pluripotentes do saco vitelino coletados de ratas no 15º e 20º dia de gestação (dg) em condições normais e hiperglicêmicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FORMAÇÃO DO SACO VITELINO

O desenvolvimento embrionário se inicia após a fusão de um gameta feminino e masculino, resultando em uma célula diploide chamada zigoto. Após repetidas clivagens, ocorre a formação do blastocisto que passa por diversas modificações até a formação do disco embrionário, o qual dá origem às camadas germinativas que formam todos os tecidos e órgãos do embrião. Adicionalmente, formam-se nesse estágio, as estruturas extra-embrionárias: cavidade amniótica, saco vitelino (SV), pedículo do embrião e saco coriônico (MOORE, PERSAUD, 2004).

O período gestacional em ratas tem duração em torno de 21 dias $\pm$ 24 horas. A implantação do blastocisto ocorre entre o 4º e o 5º dia de gestação (dg). Até a formação da placenta que ocorre no 11º dg, o embrião depende das trocas entre o sangue materno extravasado na decídua e as estruturas extra-embrionárias para nutrição e as trocas metabólicas. Entre outras estruturas o saco vitelino é um anexo embrionário, que em ratos desempenha um papel nutritivo importante, durante a primeira metade da gravidez (JOLLIE, 1990), apresentando como uma estrutura em forma de saco ligada a região ventral do embrião.

Inicia sua formação por volta do 7º dia de gestação e alcança o seu desenvolvimento ao redor do 10º dia de gestação até o estabelecimento da circulação carialantóide (CARNEY, et al., 2004). Desempenha várias funções durante o desenvolvimento gestacional, tais com a nutrição do embrião, síntese proteica, atividade fagocitária, além da capacidade de originar células tronco multipotente e pluripotentes. (RIVEROS, 2010).

Morfologicamente a parede do saco vitelino é constituída por três camadas sobrepostas: um epitélio de revestimento endodérmico interno, um epitélio de revestimento externo que corresponde ao mesotélio em contato direto com o exoceloma e um tecido mesenquimal entre ambas as superfícies, que contém vasos sanguíneos, tecido hematopoiético e macrófagos (RIVEROS, 2009).

Nos ratos, o saco vitelino inicia sua regressão por volta da segunda ou terceira semana gestacional, à medida que o alantóide se expande para se fundir com o córion. (HAFEZ; 2004; MIGLINO et al., 2006; MIGLINO. 2009.). O processo de diferenciação placenta se inicia por volta do dia 12 de gestação (AKAZAWA, 2005), formando as ligações vasculares necessárias para o transporte de nutrientes (JOLLIE, 1986 e MARANGHI et al., 1998).

Na maioria dos roedores o saco vitelino sofre um processo de inversão junto a placenta principal formando a placenta vitelina. Durante a maior parte da gestação, o saco vitelino do rato é a placenta funcionante do embrião no período inicial da organogênese, contém camadas de células gigantes trofoblásticas e um grande teor de proteínas (CHARLES, et al.1975).

Nos roedores tais como os ratos o saco vitelino persiste até o nascimento como uma estrutura enrugada altamente vascularizada sendo o primeiro local de produção de células sanguíneas no rato (LEE, et al., 1983; BJORKMAN et al , 1989). É de grande importância como um mediador de trocas entre a mãe e o embrião, é responsável pela nutrição do embrião entre a 6<sup>o</sup> e o 10<sup>o</sup>-11<sup>o</sup> dia de gestação (dg). (WENCESLAU, 2009).

### **2.1.2 Relações Morfofuncionais do Saco Vitelino**

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

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

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

A formação do saco vitelino inicia-se quando o hipoblasto (endoderma) sofre deslocamento e delamina-se, dando origem à cavidade de blástula. O mesoderma formado no botão embrionário primitivo migra entre o epiblasto e o hipoblasto (MOSSMAN 1987;

JUNQUEIRA; ZAGO, 1982). Este transforma a blástula em uma estrutura de três camadas. O epiblasto é transformado no trofoblasto do cório. A cavidade revestida pelo endoderma é o saco vitelino, área que circunda o vitelo. Este completa seu desenvolvimento no momento em que a porção extraembrionária de celoma se alarga. Assim, o saco vitelino é uma esplancopleura, que inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica. Constituído por células originadas a partir do disco embrionário, ele forma inicialmente uma camada fina de ectoderma (saco vitelino unilaminar ou onfalopleura). Subsequente a migração de células das camadas internas, do endoderma para o ectoderma, forma o saco vitelino bilaminar e, finalmente, o crescimento do mesoderma, entre os dois primeiros, dão origem ao saco vitelino trilaminar. (MOSSMAN, 1973; WOODING; BURTON, 2008). Caso não esteja presente o vitelo, há o desenvolvimento das duas últimas camadas da mesma forma que gera um blastocisto unilaminar, que produz a partir de uma esfera sólida de células a mórula (WOODING;BURTON,2008).

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

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

Durante a fase inicial de alojamento do saco vitelino, o endoderma diferencia-se, em células prismáticas e células achatadas, as quais acompanham o trofoblasto (RUSSE et al., 1992)

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

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

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

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

Por volta do 12º dia de idade o blastocisto humano, as células endodérmicas começam a revestir internamente a membrana de Hauser, formando a cavidade, denominada de saco vitelino secundário ou definitivo (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005).

Este novo saco é menor e localiza-se entre o âmnio e cório, na cavidade celômica extraembrionária. Permanece unido ao embrião pelo pedículo vitelino através alça intestinal média (PEREDA et al., 1988; SADLER, 2005) ficando aberto para a cavidade vitelina.

Durante os dobramento do embrião o saco amniótico empurra o saco vitelino, ficando este preso ao corpo do embrião por um fino pedículo vitelino. O saco vitelino, nos mamíferos, persiste apenas como uma estrutura rudimentar, bem como o pedículo alantoico, mais caudal que o primeiro, ficando incorporado pelo cordão umbilical (GARCIA; FERNANDEZ, 2001).

O saco vitelino, em humanos, é um órgão flutuante na cavidade excelômica, entre a placenta e a cavidade amniótica, participando do desenvolvimento do embrião. Está, durante a 6º semana de gestação, como uma estrutura esférica e cística, coberta por numerosos vasos superficiais pequenos, os quais se fundem na base do ducto vitelino e liga o saco vitelino á

parte ventral do embrião, diretamente ao intestino e á principal circulação sanguínea (GONZALES – CRUSSI; ROTH, 1976; JONES; JAUIAUX, 1995).

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

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

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

### **2.1.3 Aspectos macroscópicos e microscópicos do saco vitelino em diferentes espécies**

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

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

Riveros (2009) observou diferenças morfológicas do saco vitelino no início do desenvolvimento, fase de atividade vitelina e fase de degeneração da membrana ainda em idade embrionária, na espécie bovina. Aos 24 dias de desenvolvimento embrionário, o saco

vitelino apresentou alças alongadas do p elculo embrionário, já aos 37 dias, o saco vitelino encontra-se vascularizado, justaposto ao  nio e ao cordão umbilical de onde parte toda a vasculariza o da membrana c rioalantoide.

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

  descrito ainda que a involu o do saco vitelino nos ruminantes começa perifericamente nos extremos e avança centripetamente (RUSSE et al., 1992) sendo que partir da segunda semana gestacional, seus vestígios não são mais encontrados (BARONE; 1976). Entretanto, a fun o do saco vitelino   estendida na placenta esférica da água enquanto o alantoide se expande gradualmente para substituí-lo no 30  dia de gesta o (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na maioria dos roedores o saco vitelino sofre um processo de inversão junto a placenta principal, formando a placenta vitelínica. O saco vitelino da paca (*Cuniculus paca*) e da cutia (*Dasyprocta aguti*)   invertido e vascularizado (CONCEI O et al., 2008).

#### **2.1.4 Fun o do saco vitelino**

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

Muitos autores enfatizam a grande importância funcional do saco vitelino para o processo metabólicos entre a mãe e o feto (LARSEN, 1963 CARPENTER; FERM, 1969). Entretanto alguns estudos mostraram que o saco vitelino também tem influência essencial nos processos metabólicos e no transporte durante o período final da gesta o (KAUFMANN; DAVIDOFF, 1977).

Bloom e Bartelmez (1940) e Russe et al., (1992) descrevem que o saco vitelino   o primeiro órgão hematopoiético do embrião, além de demonstrar uma importante atividade de macrofagocitose, biossíntese de proteínas e transporte de nutrientes para o embrião, até o fígado embrionário ter amadurecido suficientemente para exercer suas fun es (MIGLINO, 2009 TIEDEMANN, 1979, LIU et al., 1991).

Em muitas espécies de mamíferos, o saco vitelino produz e transporta proteínas necessárias ao desenvolvimento do embrião (RIVEROS, 2009), de forma seletiva (KING, 1982), participa no intercâmbio de metabólicos (DOCHERTY et al., 1996) podendo ser um excelente modelo para estudo de toxicidade.

O Saco vitelino atua na degradação de proteínas que mais uma vez oferece um importante papel na nutrição fetal (KING, 1982). Sua função nos mamíferos é complexa, participando da hematopoiese (FUKUDA, 1983; TIEDEMANN, 1979) e transferência de material materno, tais como vitaminas aminoácidos (SHI et al., 1985).

Tiedemann (1979) afirmou que o saco vitelino de gatos possui vasos sanguíneos fenestrados e apresenta membrana basal completa. Estas condições são favoráveis à passagem de proteínas e de células sanguíneas, produzindo ainda as células germinativas que constituirão as células precursoras dos gametas: espermatozoides e oócitos.

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

Riveros (2009) descreveu a análise proteômica (estrutural e bioquímica) do saco vitelino em bovinos e encontrou nos 23 a 37 dias de gestação a presença de 970 a 1230 proteínas contidas no saco vitelino, respectivamente. O saco vitelino de 23 dias apresentou proteínas essenciais, diferencialmente expressas nos estágios de desenvolvimento, como: Hemogen, proteína responsável pelo controle da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas; a glicoproteína N-acetilgalactosamina 3-beta- galactosiltransferase -1, envolvida nos processos de angiogênese, trombopoiese e no desenvolvimento da placenta.

O mesmo autor percebeu que o saco vitelino de 37 dias possuía proteínas essenciais deste estágio como a apolipoproteína, podendo servir como uma ligação para o receptor de LDL e para receptores específicos de apolipoproteína e dos tecidos hepáticos durante a embriogênese. Estas proteínas são de vital importância para o desenvolvimento do embrião até a formação da placenta.

Nos roedores, o saco vitelino é o principal órgão nutritivo do embrião antes da formação da placenta alantoide funcional. No camundongo, o saco vitelino é desenvolvido e similar ao da ratazana, envolvendo completamente o âmnio durante a maior parte da gestação (MCLAREN 1975). Em muitos roedores e lagomorfos, o saco vitelino é ativo na nutrição do

embrião e do feto (KING,1982), ou seja nestas espécies o saco vitelino persiste também durante o período fetal,

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

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

## 2.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco embrionárias são formadas a partir da fecundação do espermatozoide ao óvulo, originando o zigoto. O zigoto, quando implantado no útero, passa por várias divisões mitóticas dando origem um emaranhado de células embrionárias que se diferenciam em folhetos germinativos, formando órgãos e tecidos, até a oitava semana, recebendo o nome no final de embrião. A partir desta semana até o nascimento denomina-se de feto (HARTWELL, 1970; TABER, 2000).

As células-tronco são originadas das mitoses que sofre o zigoto (NURSE, 1976). Até o final da formação da mórula, mais precisamente no terceiro dia de desenvolvimento. O zigoto é composto de células capazes de guardar as características genéticas do indivíduo, podendo evoluir para qualquer tipo de célula (CARVALHO, 2001). E por células adultas responsáveis por manter o perfeito equilíbrio dos tecidos, repondo células que foram perdidas na maturação, e no envelhecimento (OLIVEIRA; SPONCHIADO; ADAM, 2006).

Essas células têm estruturas simples, podendo se diferenciar em outro tipo de célula formando qualquer tipo de tecido e são classificadas quanto a sua origem como: células tronco embrionárias e células tronco adultas e fetais (BOHELER, 2005).

Essas células podem ser ainda classificadas segundo sua propriedade de pluripotencialidade como: totipotentes, capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero. Estão presentes nas primeiras fases da divisão, quando o embrião tem até 16 a 32 células, ou seja, de três ou quatro dias de vida,

(MCKAY, 2000; KARPOWICZ et al., 2004) Em células-tronco pluripotentes as quais podem originar todas as células que formam um embrião e são provenientes da massa interna, são encontradas na fase em que o embrião é um blastocisto a partir de 32 a 64 células, surge aproximadamente à partir do 5º dia de vida. (MACLAREN, 2001). Em células multipotentes que são aquelas cuja capacidade origina um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as células mesenquimais e neurais.

Existem ainda células oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem e encontram-se no trato intestinal, e as unipotentes que são aquelas que originam apenas um único tipo celular maduro, e estão presentes no tecido cerebral adulto e na próstata (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

As células tronco podem ser definidas por possuir capacidade funcional de: auto-renovação, ou seja, capacidade de regeneração de originar outra célula tronco com características idênticas; se diferenciar em mais de um tipo celular; e capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILLIE et al., 2002; WEISSBERG; QASIM 2005; LERI et al., 2004; KIERZENBAUM, 2008).

As células-tronco têm duas características importantes que as distinguem de outros tipos celulares. Primeiro, elas são células não especializadas que se renovam por períodos longos, por meio de divisões celulares. Segundo, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, elas podem ser induzidas a transformar-se em células com funções especiais.

Em 1986, essas células foram isoladas com a utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície (MULLER-SIEBURG, et al., 1986). Thomson, 1998 retirou células tronco de embriões em clínicas de fertilidade e as cultivou em laboratório. Estas células se mantiveram indiferenciadas em cultura na presença e fatores tróficos, e formavam teratomas (tumores com células de todos os folhetos embrionários) quando injetadas sob a pele de animais imunodeficientes, o que demonstrava a sua pluripotencialidade (THOMSON et al., 1998).

Estudos comprovaram que as células tronco existentes no saco vitelino de mamíferos possuem uma grande capacidade de se diferenciar não somente em eritrócitos nucleados embrionários primitivos, mas também em eritrócitos maduros, linfócitos, células mielóides além de células que compõem a linhagem celular sanguínea definitiva (MEDVINSKY et al., 1993; AUERBACH, et al., 1998; JAFREDO et al., 2005).

Trabalhos realizados por Globerson et al., (1987); Liu e Auerbach (1991) e Godin et al.,

(1995) identificaram uma população pluripotente de células no saco vitelino capazes de se diferenciarem em células hematopoiéticas.

Células tronco pluripotentes do saco vitelino são capazes de originar mais de 250 tipos diferentes de tecidos do adulto em um processo de proliferação celular extremamente coordenado. São retiradas do embrião em sua fase inicial de desenvolvimento, ou do feto ou de um tipo de célula híbrida em um processo chamado de transferência de núcleo somático também conhecido como clonagem (ZAGO; COVAS, 2006).

### 2.3 FASES DO CICLO CELULAR

A proliferação celular é um mecanismo extremamente coordenado no qual a progressão pelas fases do ciclo é regulada de modo muito preciso, por uma rede bioquímica muito complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2, M (SCHAFFER, 1998). O ciclo da divisão celular é coordenado e regulado por meio de eventos em que as células duplicam seu material genético (DNA) e posteriormente entram em divisão, formando células filhas. (NAKAJIMA, 2010).

A ativação da divisão nuclear e o processo de separação das células filhas ocorrem na mitose e que corresponde a fase M. O período entre uma mitose e outra é chamado de intérfase. O processo de replicação do DNA nuclear ocorre geralmente somente na fase S, quando o DNA é sintetizado (período de síntese).

O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA, é chamada de fase G 1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2. Essas fases propiciam um tempo adicional para o crescimento celular. (NAKAJIMA, 2010; SCHAFFER, 1998) Esse processo é fundamental para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar o processo de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Pesquisadores têm demonstrado que diversas patologias, tais como a diabetes podem levar o surgimento de mutações e aberrações interferem diretamente nos mecanismos envolvidos no processo do ciclo celular (MAYHEW et al., 2004; PERES et al., 2009).

### 2.4 MARCADORES DE MORTE CELULAR E APOPTOSE

A morte celular é considerada um processo ativo de caráter degenerativo, que pode estar

envolvida diretamente em situações de lesão celular, infecção, ou ausência de fatores de crescimento, além de poder ser induzida por patologias que interfiram no processo de manutenção vital da célula. (HENGARTNER, 2000; GRIVICICH, 2007; FAUCZ, 2011).

Na medida em que se desencadeia-se o processo de morte celular, a célula altera sua atividade normal e a integridade da membrana plasmática, aumentando de tamanho e consequentemente perdendo sua capacidade metabólica. Células que morrem por injúria aguda tipicamente edemaciam, podendo extravasar o seu conteúdo favorecendo a uma resposta inflamatória nas células ao redores. (FAUCZ, 2011).

No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte. Cientificamente, os processos de morte celular podem ocorrer de duas formas de acordo com suas características bioquímicas e morfológicas distintas, pode ser por um processo de morte celular acidental, conhecida mais precisamente como necrose e a morte celular programada, ou autofagia por apoptose (HENGARTNER, 2000; OKADA, 2004).

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (LOCKSHIN, et al 1964). Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie (1972) sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose é um dos fenômenos biológicos de maior relevância em diferenciação celular e tecidual, ocorre nas mais diversas situações, como na organogênese, no desenvolvimento normal e patológico, funcionando como sistema controlador da homeostase através da eliminação não inflamatória de células desnecessárias ou irreversivelmente lesadas (GRIVICICH, 2007).

As células em apoptose sofrem morte celular programada sem acometer estruturas vizinhas. É um mecanismo de autodestruição celular que requer energia e síntese proteica para a sua execução, e exerce um papel oposto ao da mitose (BARCINSKI, 1998).

Muitas evidências sugerem que a mitocôndria tem potencial de transdução de sinal e execução de morte por possuir habilidades de desencadear a apoptose, liberando para o citoplasma proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c e o Fator Indutor de apoptose (WELBURN et al., 1997).

A identificação e separação destas diferentes populações de células recaem sobre combinações de marcadores de superfície, uma vez que nenhuma delas possui um marcador exclusivo. O Citocromo C uma das proteínas liberadas pela mitocôndria, promove a ativação da pro-caspase-9 que desencadeia a ativação de outras caspases, culminando no processo de

morte celular por apoptose. (ORRENIUS, 2004). A compreensão de mecanismos apoptóticos pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do diabetes.

## 2.5 MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO E DIFERENCIAÇÃO

As células tronco embrionárias são caracterizadas por possuir dois potenciais únicos autorrenovação e pluripotência. Há uma grande variedade de fatores de transcrição essenciais para a manutenção e vitalização dos estágios das células-tronco (WENSCELAU, 2009).

Entre eles o Oct 3/4 é o melhor caracterizado, por possuir propriedades essenciais para a manutenção de diferentes tipos celulares, além de encontrar-se diretamente ligado ao processo de autorrenovação das células-tronco embrionárias indiferenciadas e por ser expresso acima de um nível crítico para preservar o estado da célula tronco (GALDOS, 2012).

A proteína Oct 3/4 é um fator de transcrição que tem um potencial de diferenciação e codificação do perfil celular, no desenvolvimento precoce das células totipotentes e pluripotentes expressando-se no estágio de blastocisto (SAITO, 2012).

Na fase de blastocisto o POU5F1 e SOX2 são expressos na massa celular interna e camada externa denominada de trofoectoderma e são necessárias para manter a reprogramação das células e estabelecer sua pluripotência e não na camada externa denominada de trofoectoderma. (SAITO, 2012; GALDO, 2012).

Um outro fator de transcrição envolvido na auto-renovação de células-tronco embrionárias é a NANOG, que em humanos é um fator chave na manutenção da pluripotência, além de atuar juntamente com a POU5F1 e SOX2 no processo de auto – renovação e na formação dos folhetos embrionários (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004).

É por esta razão que a compreensão dos mecanismos que mantêm a pluripotência de uma célula é fundamental para entender como as células-tronco, e pode levar a futuros avanços no tratamento de doenças degenerativas (MITSUI et al., 2003).

Stro -1 é um marcador específico marcador de células tronco mesenquimais é o mais conhecido entanto sua expressão é mais observada no endotélio não sendo exclusivo para este tipo celular (NING, 2011; GALDOS, 2012).

O CD 90 é um marcador expresso em uma série de linhagens celulares fibroblásticas e estromais, endotélio, e algumas linhagens celulares tumorais. Está envolvido na adesão e migração celular (SICLARI; QIN, 2010).

CD 117 ou c-kit apresenta significativa marcação para células vitelinas, tem alta expressão em células tronco hematopoiéticas primitivas do cordão umbilical, além de ser um gene essencialmente expresso por hemangioblasto. O CD 117 tem propriedade de auto-renovação, proliferação e diferenciação de multilinhagens (LANCRIN et al., 2009; ZAGO; COVAS, 2006; FAN, 2011 GALDOS, 2012).

O CD 34 é uma glicoproteína que funciona como fator de adesão celular e também atua mediando a ligação de células-tronco hematopoiéticas à matriz extracelular ou às células do estroma. O CD 34 expressa-se em células tronco hematopoiéticas primitivas e atua precocemente na diferenciação celular, nas células progenitoras, nas células do endotélio da microvascularização e fibroblastos embrionários em diferentes proporções. (KRAUSE, et al., 1996)

As células que apresentam em sua membrana a molécula de CD34 perfazem cerca de 1 a 3% das células mononucleares da medula óssea e entre 0,01 e 0,1% das células nucleadas do sangue (DRENOU 1996). Esta molécula está presente não só na célula tronco hematopoiética primitiva como também nas células progenitoras formadoras de colônias.

O marcador VEGF-R1, também uma glicoproteína, de crescimento vascular endotelial ou angiogênese. É um potente mitógeno de células endoteliais e promove a migração de precursores de células endoteliais. O VEGF-R1 não é a única molécula cuja expressão esta aumentada na angiogênese patológica. O VEGF-R1 é uma marcador que atua na formação dos vasos e tecidos hematopoiéticos e pode ser fundamental no período do desenvolvimento embrionário.

O VEGF foi inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular, em face de sua habilidade em promover o aumento da permeabilidade e da proliferação entre células endoteliais. Atualmente é considerado um fator preponderante na formação dos vasos, tanto no período de vasculogênese como na angiogênese (PIZA, 2012).

O marcador CD115 tem sido utilizado para melhor identificação dos monócitos. Os monócitos inflamatórios expressam altos níveis de CD115, ficam transitando entre o sangue e a medula óssea e somente extravasam quando são recrutados para um local de inflamação.

O marcador CD44 é uma proteína de superfície celular envolvida com as interações celulares, adesão celular e migração. Expressa em células hematopoiéticas, não hematopoiéticas, células epiteliais e em baixos níveis em leucócitos. CD 34 é um marcador que reage com células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais. CD117 receptor C-kit. Expressada em superfície de células progenitoras hematopoiéticas e hepatócitos (WENCESLAU, 2009).

## 2.6 DIABETES

Diabetes Mellitus é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam mais de 171 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Organização Mundial de Saúde para 2030 sugerem que esse número possa chegar a 366 milhões de pessoas (WILD et al., 2004). O Brasil encontra-se entre os dez países com maior incidência e prevalência desta doença (MS, 2011).

Líder entre as doenças metabólicas em todo o mundo a diabetes Mellitus interfere morfológicamente nos processos ativo do ciclo celular. Desencadeia desordens metabólicas severas provocadas pela hiperglicemia crônica o que ocasiona alterações celulares e teciduais, essas alterações podem variar de acordo com o tipo e a função celular (LAMES, 2008).

Em alguns tipos celulares, a hiperglicemia crônica estimula o aumento da captação de glicose podendo gerar alterações das vias metabólicas. Entre as estruturas mais susceptíveis a ação da hiperglicemia lesionando os vasos sanguíneos o que pode favorecer o surgimento de arteriosclerose e microangiopatia além de neuropatia, rins e retina (MATA *et al.*, 2004).

Um aumento da atividade glicolítica também resulta no aumento da atividade mitocondrial com consequente ativação da cadeia de transporte de elétrons. Essa hiperativação geralmente é acompanhada da geração de ions superóxido o que potencializa o dano celular podendo ocasionar sua morte (LAMERS, 2008).

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas causados por insuficiência completa ou relativa da secreção de insulina e/ou da ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

Durante a gestação, a mulher que apresenta DM pode ser classificada em: diabetes clínica pré-estabelecida (mulher previamente diagnosticada com DM tipo 1 ou 2) e diabetes gestacional (DMG, definida como qualquer intolerância à glicose detectada entre a 24-28ª semana de gestação) (FORSBACH-SANCHÉZ et al., 2005).

Distúrbios hiperglicêmicos ocorrem em cerca de 20% das gestações. Sete por cento representam casos de DM pré-estabelecida, enquanto que nos 13% restantes prevalecem distúrbios com características metabólicas distintas, mas que podem levar a taxas semelhantes de morbidade e mortalidade do recém-nascido (MAYHEW, 2002).

A hiperglicemia crônica desencadeia distúrbios metabólicos na proliferação endotelial e no crescimento vascular em diversos tecidos (MAYHEW et al., 2004). Para se avaliar os efeitos da DM, pode-se reproduzi-la experimentalmente em animais por meio da administração de dois agentes químicos como a aloxana e a estreptozotocina que apresentam citotoxicidade específica para as células beta. Essas drogas causam insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (LERCO et al., 2003).

Vários estudos utilizaram diferentes doses de aloxana e estreptozotocina, em ratas e camundongas para a indução de diabetes no período neonatal (PORTHA et al., 1985, BLONDEL et al., 1990, KODAMA et al., 1993, CAPOBIANCO et al., 2003, KISS et al., 2009), antes do acasalamento (KERVAN et al., 1978, ERIKSSON et al., 1982, PERES et al., 2009) ou durante a gestação (OH et al., 1988, OH, et al., 1991, PALOMAR-MORALES et al., 1998) apresentando resultados diversos no que diz respeito à severidade da doença e às perdas gestacionais.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o perfil de proliferação, e potencial de divisão celular das células pluripotentes indiferenciadas obtidas do saco vitelino, de ratas induzidas a diabetes.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar a distribuição das células pluripotentes nas fases do ciclo celular;

Caracterizar a atividade do potencial elétrico mitocondrial das células-tronco do saco vitelino;

Caracterizar a proporção de células de acordo com a ploidia;

Avaliar a expressão de marcadores de proliferação, morte celular e pluri e totipotência.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa em Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe – N° CEPA 86/11

### 4.1 METODOLOGIA

Esta pesquisa é descritiva e experimental. Foram analisados e interpretados os aspectos da proliferação e caracterização de células do saco vitelino da placenta de embriões de ratas Wistar. Foi também analisada e interpretada a relação do potencial metabólico mitocondrial, as relações da apoptose e da cinética do crescimento celular, durante os períodos gestacionais (15° e 20°dg). A determinação e caracterização dos marcadores de células-tronco por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

#### 4.1.2 Animais e procedimento experimental.

Para a análise das células pluripotentes do saco vitelino foram utilizados vinte fêmeas e cinco machos Wistar adultos (*Rattus norvegicus*), pesando entre 200-250g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe.

Os machos desta pesquisa foram utilizados apenas para o coito animal. Os animais foram mantidos na proporção de 4 fêmeas para cada macho e mantidos sob condições controladas de temperatura 22 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Os animais receberam água filtrada e ração específica para roedores (Labina, Purina®, Paulínia-SP, Brazil).

Após a confirmação de espermatozóide no esfregaço vaginal (considerado como 1° dia de gestação, dg), as fêmeas foram separadas. No 8° dg, após jejum de 12 horas, 10 ratas receberam aplicação de aloxana (37 mg/kg) por via endovenosa –IV por meio da veia caudal (grupo diabético - SVD) e 10 fêmeas receberam solução salina (grupo controle - SVC). Em seguida à aplicação de aloxana os animais receberam solução glicosilada (10%) na água de beber durante 24 horas para evitar as complicações da hipoglicemia aloxânica (LENZEN, 2008).

A glicemia foi avaliada no 8°, 10° e 14° 19° dg em glicosímetro digital portátil (Accu-Check Performa Roche®) por meio de escarificação da ponta da cauda e os valores expressos

em miligramas por decilitro (mg/dL) de sangue. Foram considerados diabéticos os animais com glicemia acima de 200mg/dl no 10° dg.

No 15° e 20° dg, as fêmeas prenhes do grupo experimental e do grupo controle foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de Xilazina 20 mg/kg (Anasedan - Sespo) e cloridrato de Ketamina 80 mg/Kg (Dopalen - Sespo); após a anestesia os animais foram ortotansados por decapitação, seguindo-se a laparotomia para a coleta dos cornos uterinos.

#### **4.1.3 Coleta das Amostras de Saco Vitelino e obtenção das Células Pluripotentes de Saco Vitelino**

Foram coletadas cinco placentas de cada animal de cada grupo (SVC = cinco animais, SVD = cinco animais) aos 15° dg e 20°. Cada placenta foi dissecada em placa de Petri estéril com solução salina estéril e em banho de gelo para remoção do saco vitelino. Os sacos vitelinos foram acondicionados em novas placas e soluções estéreis ainda em banho de gelo e submetido a dissociação mecânica com o auxílio de pistilo de cerâmica, seguindo-se a filtração em filtro estéril de 25mm de diâmetro acoplado a seringa estéril, a suspensão de células foi mantida em 1 mL de solução de congelamento, composta por 10% de dimetil-sulfoxido e 60% de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) e 30% de soro fetal bovino e mantidos a -70 ° C.

#### **4.1.4 Análises das Fases do Ciclo nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo**

Para a obtenção das populações celulares, foram realizadas duplicatas das amostras dos grupos SVC e SVD. Um total de 16 amostras, de ambos os grupos, foi analisado em citômetro de fluxo (FACS calibur, Beckton Dickson) quanto ao perfil das fases do ciclo celular.

A preparação das amostras para a citometria de fluxo foi realizada como se segue As amostras foram separadas do gelo, e descongeladas em temperatura ambiente, foi adicionado em cada microtubo 500 µL de tampão Fac's Flow e centrifugados a 12000 rpm, por 10 minutos. Após este período, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso novamente em a 200 µL tampão Fac's Flow (SHAPIRO, 2000). Posteriormente foi acrescentado 10 µL de iodeto de propídio (IP) para distinção das células apoptóticas de células necróticas, na concentração de 18ug/mL permanecendo por 20 minutos (STURM et al. 2006).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e ressuspenso em 200 µL tampão Fac's Flow. As amostras foram armazenadas em gelo para transporte até o momento das análises no citômetro de fluxo.

Os microtubos foram analisados por sequência de 1 a 16 em seus respectivos grupos em relação ao ciclo celular e de acordo com a sua intensidade de fluorescência (BHATT, 2007; FECHER, 2009). Os resultados de ciclo celular são expressos em porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado, sub - G1 (apoptose), fase quiescente G0/G1, Fase de síntese - S e Fase G2/M (SCHWARTZ, 2005).

#### **4.1.5 Análises do Potencial Metabólico da Membrana Mitocondrial Sonda Rodamina 123 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo.**

Para análise do potencial metabólico da membrana mitocondrial aplicou-se o mesmo método de preparação das amostras descrito acima adaptado para esta análise, utilizando-se assim, a sonda fluorescente rodamina123 por Citometria de Fluxo. (SHAPIRO, 2000), como se segue:

Após a centrifugação, a solução foi desprezada e as células foram ressuspendidas em 200 µL de tampão Fac's e adicionados 5µL da sonda rodamina 123 diluída em dimetil sulfóxido na concentração final de 5µg/mL e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), a 37° por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 250 µL de tampão FACS Flow.

#### **4.1.6 Expressão de marcadores de maturação, diferenciação de células-tronco. Os marcadores utilizados foram: Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4, CD117, CD115, CD 44, CD34, VEGF-R1, COX-2, MCP -1, INF- $\gamma$ R1, 1 L-1F e a Caspase 3 - fosforilada.**

A amostra do SV mantida em banho de gelo foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida, foi adicionado 40 µl de tampão Facs Flow e o anticorpo primário específico para cada molécula CD (Clone de diferenciação), e após 2 horas foi adicionado o anticorpo secundário (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen) marcado com FITC e incubado durante a noite a 4°C. A suspensão foi transferida para os tubos de citometria, para realizar a leitura. Análises de expressão em 10.000 eventos foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur®, e as aquisições dos dados analisados pelo programa WinMDI 2.9. A expressão de

marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com fluorocromo FITC inespecífico.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises finais foram realizadas utilizando o software ModFitLT v. 2.0 (PMac) e WinMDI 2.8 (PC), no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantã. As análises estatísticas foram desenvolvidas no software GraphPad (Prism 5.0) utilizando o teste one way ANOVA e Tukey de comparação considerados significativamente diferentes os valores de  $p < 0,05$ .

## **6 RESULTADO**

Os resultados deste trabalho estão organizados de acordo com os seguintes critérios: Expressão da atividade mitocondrial em células do saco, Análise das fases do Ciclo Celular das células do saco vitelino, Análise da proporção e distribuição do DNA/célula e a Ploidia das células do saco vitelino, Expressão dos marcadores e receptores celulares das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo.

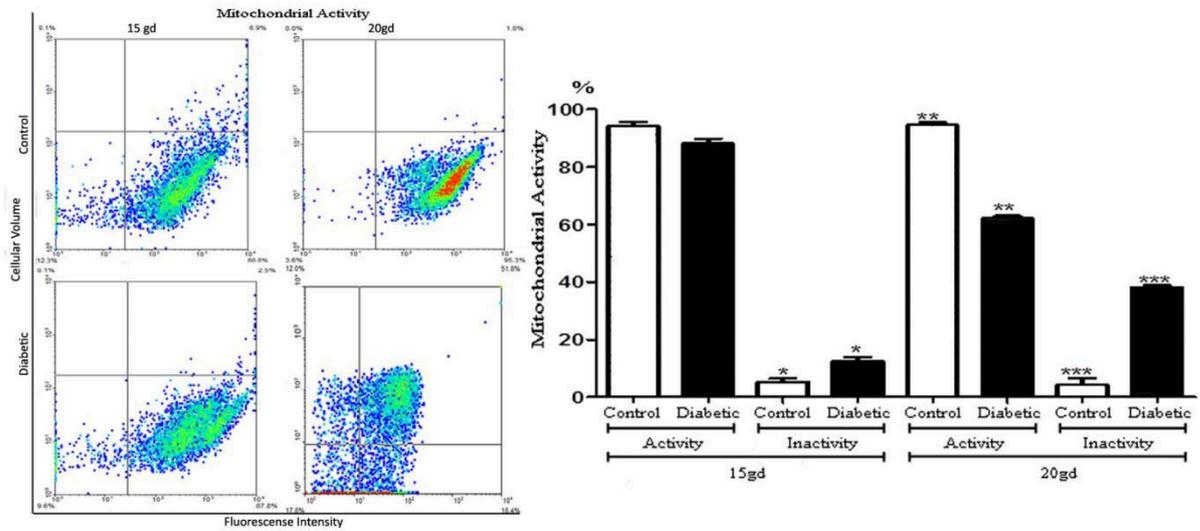
### **6.1 EXPRESSÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DO SACO VITELINO.**

A análise da expressão da atividade mitocondrial é expressa em porcentagem de distribuição e expressão. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 1.

**Tabela 1** – Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos o potencial elétrico mitocondrial em células do saco vitelino.

	SVC		SVD		SVC		SVD	
	15 dg		15 dg		20 dg		20 dg	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativo	Positivo	Negativo	Positiva	Negativo
<b>Valores Médios (%)</b>	92,84	6,155 <sup>a</sup>	89,02	11,57 <sup>b</sup>	95,45 <sup>c</sup>	1,890 <sup>c</sup>	62,10 <sup>d</sup>	38,04 <sup>f</sup>

(a-b, c-d, e-f) Diferença significativa  $P < 0,05$ .



**Figura 01** – Expressão da atividade mitocondrial em células do saco vitelino nos grupos controle e diabéticos de 15 dg e 20 dg. A esquerda, gráfico do tipo Dot plot adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células em atividade. A direita, gráfico Representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da atividade mitocondrial em células do Saco Vitelino. \*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

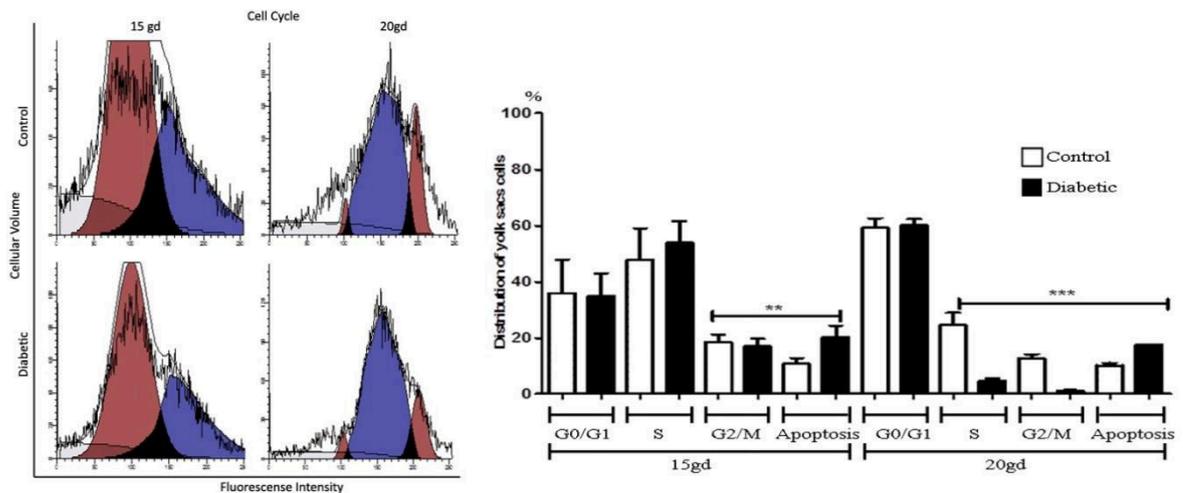
## 6.2 ANÁLISES DAS FASES DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO.

A análise das fases do ciclo celular demonstrando a porcentagem e expressão das células durante as fases de divisão celular. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 2.

**Tabela 2** – Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos as fases do ciclo celular em células do saco vitelino.

Grupo/período	Controle		Diabético	
	15 dg	20 dg	15 dg	20 dg
<b>Ciclo Celular</b>				
<b>Apoptose</b>	9,005	10,98 <sup>a</sup>	10,47	20,47 <sup>b</sup>
<b>Fase G0G1</b>	29,67	62,17	29,99	59,99
<b>Fase S</b>	50,17	22,33 <sup>c</sup>	58,67	6,003 <sup>d</sup>
<b>Fase G2M</b>	19,39	12,18 <sup>c</sup>	15,13	3,003 <sup>f</sup>

a -b,c,d, e-f Diferença significativa  $P < 0,05$ .



**Figura 02** – Expressão do ciclo celular das células do saco vitelino nos grupos controle e diabéticos de 15 dg e 20 dg. A esquerda gráfico do tipo Dot plot adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células ao longo do ciclo celular. A direita, gráfico representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem do ciclo celular das células do Saco Vitelino. \*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido peloteste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013)

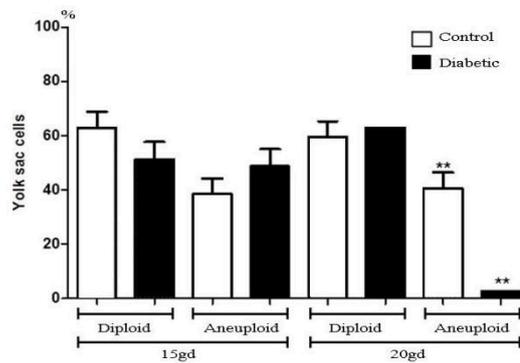
### 6.3 ANÁLISE DA PROPORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO DNA/CÉLULA E A PLOIDIA DAS CÉLULAS DO SACO VITELINO.

A análise proporção e distribuição do DNA/célula e a Ploidia das células do Saco Vitelino. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 3.

**Tabela 3** – Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos a proporção e distribuição do DNA/célula e a ploidia das células do saco vitelino.

Diplóide	Aneuplóide	Diplóide	Aneuplóide	Diplóide	Aneuplóide	Diplóide	Aneuplóide
Controle	Controle	Diabético	Diabético	Controle	Controle	Diabético	Diabético
15 dg	15 dg	15 dg	15 dg	20 dg	20 dg	20 dg	20 dg
65,28	37,31	54,87	45,14	64,79	35,32 <sup>a</sup>	62,93	2,590 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Diferença significativa  $P < 0,05$



**Figura 03** - Representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da proporção e distribuição do DNA/célula e a Ploidia das células do Saco Vitelino dos grupos controle e diabéticos de 15 e 20 dias de experimentação.

\*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

#### 6.4 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO CELULAR DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

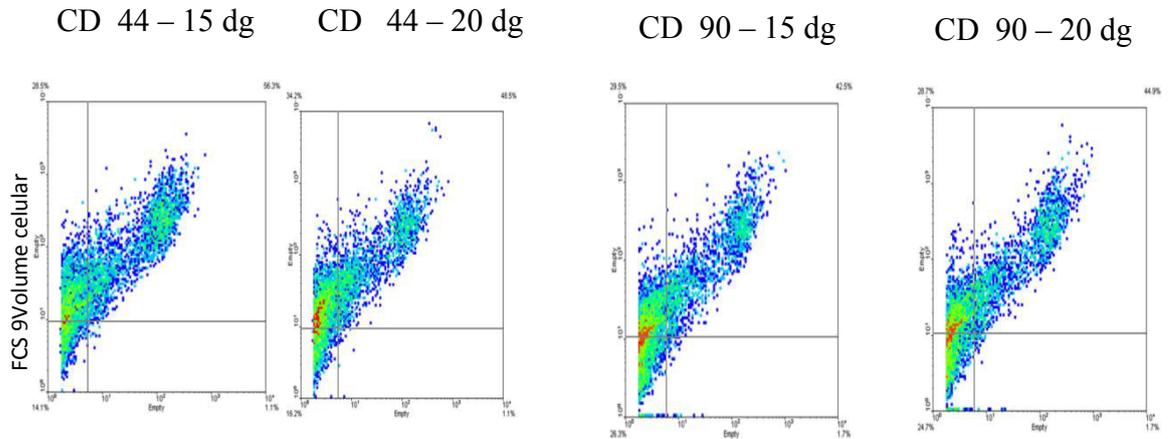
A análise da expressão dos marcadores e receptores celulares das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 4.

**Tabela 4** – Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético células do saco vitelino.

CD 44		CD 44		CD 90		CD 90	
Controle 15 dg	Controle 20 dg	Diabético 15 dg	Diabético 20 dg	Controle 15 dg	Controle 20 dg	Diabético 15 dg	Diabético 20 dg
45,95	48,80 <sup>a</sup>	45,20	24,20 <sup>b</sup>	53,40 <sup>c</sup>	54,45	77,90 <sup>d</sup>	51,45

<sup>a-b, c-d</sup> Diferença significativa  $P < 0,05$ .

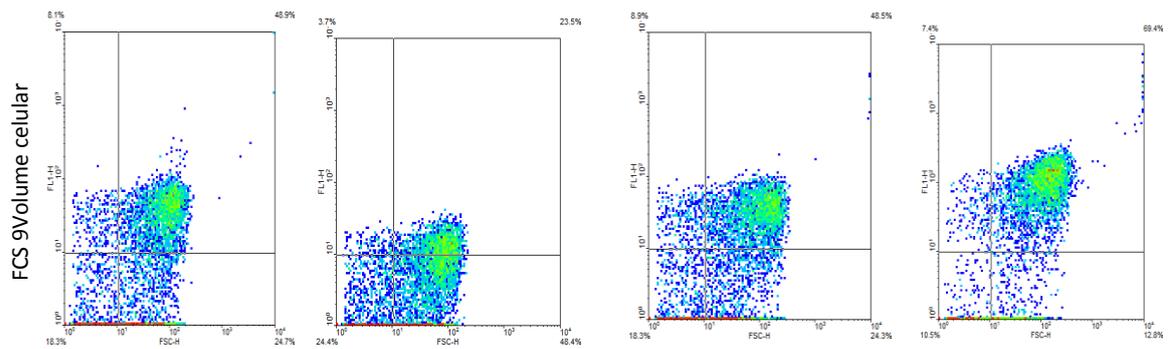
**Controle**



Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)

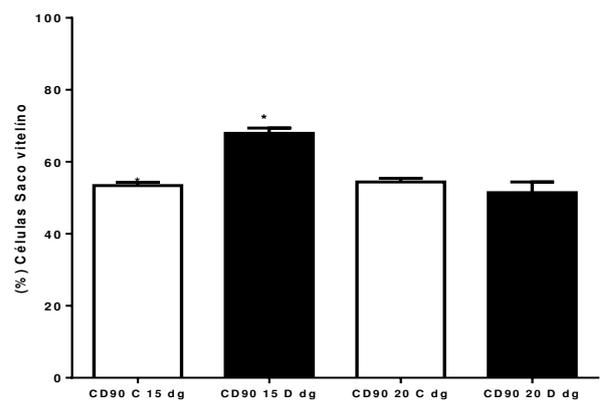
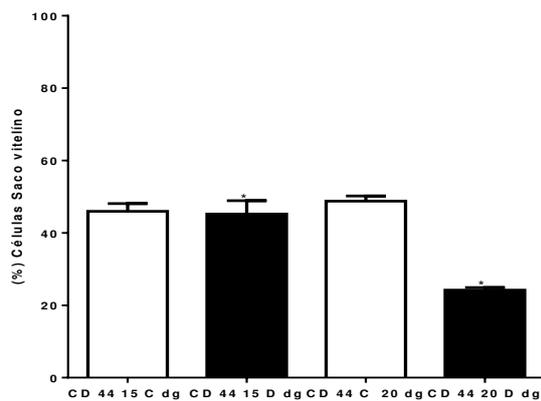
Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)

**Diabético**



Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)

Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)



**Figura 04** – Expressão dos marcadores envolvidos na migração celular das células do saco vitelino nos grupos controle e diabéticos de 15 dg e 20 dg. Acima gráfico do tipo Dot plot adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células que expressam CD 44 e CD 90. Abaixo, gráfico representando a média ± desvio padrão da porcentagem da proporção e distribuição dos marcadores envolvidos na migração celular.

\*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

## 6.5 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DOS VASOS E POTENCIAL HEMATOPOIÉTICO GRUPO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

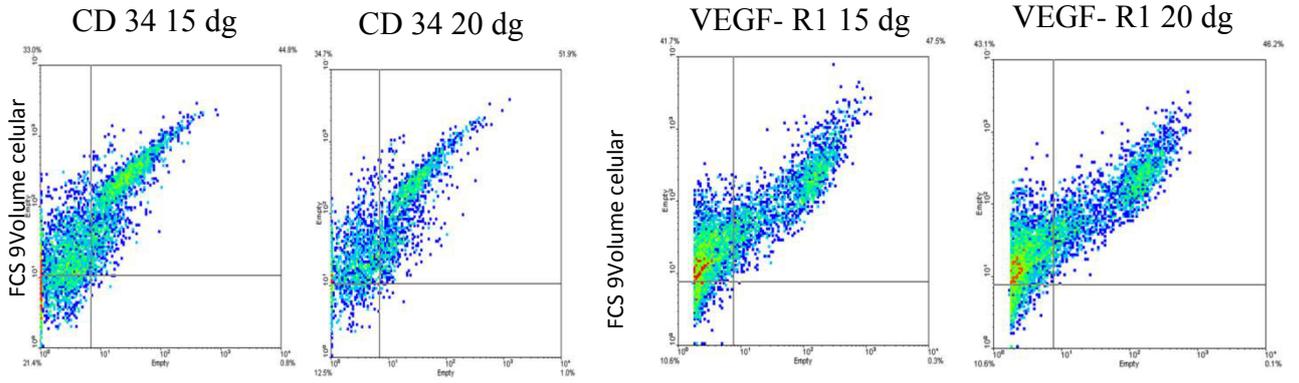
A análise da expressão dos marcadores envolvidos na formação dos vasos e potencial hematopoiético das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 5.

**Tabela 5**– Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino.

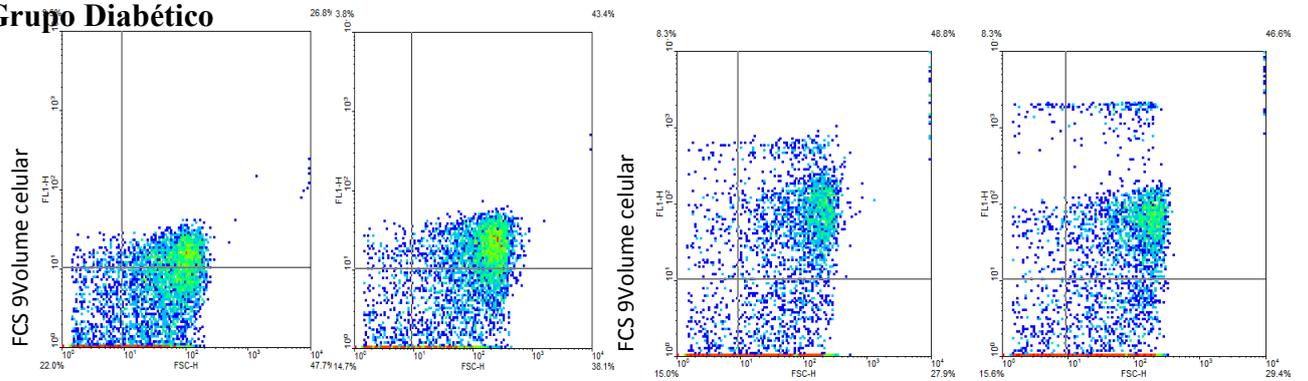
Grupo/período	Controle		Diabético	
	15 dg	20 dg	15 dg	20 dg
<b>CD 34</b>	39,25	37,22 <sup>a</sup>	27,80 <sup>c</sup>	45,60
<b>VEGF-R1</b>	53,74	59,30 <sup>b</sup>	53,25 <sup>d</sup>	55,70 <sup>e</sup>
<b>CD 117</b>	45,45	46,30	55,20	46,80
<b>MCP -1</b>	53,40	51,71	45,25	48,65

Diferença significativa  $P < 0,05$ .

**Grupo Controle**

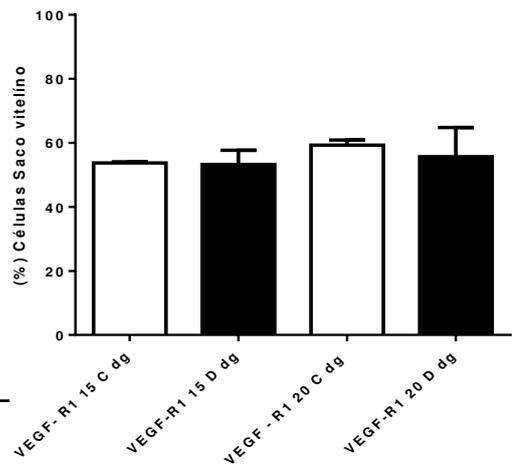
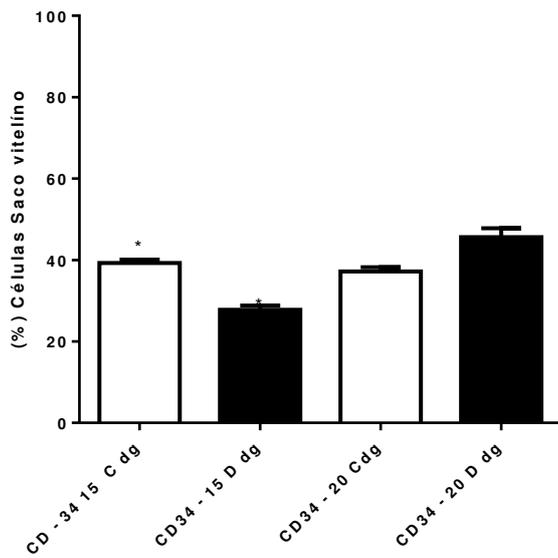


**Grupo Diabético**



Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)

Intensidade de Fluorescência (FL2 –H)



**Figura 05** – Expressão dos marcadores envolvidos na formação dos vasos e potencial hematopoiético das células do saco vitelino nos grupos controle e diabéticos de 15 dg e 20 dg. Acima gráfico do tipo Dot plot adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células que expressam CD 34 e VEGF-R1. Abaixo, gráfico representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da proporção de marcadores envolvidos na formação dos vasos e potencial hematopoiéticos. \*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

## 6.6 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA ORIGEM E PLURIPOTÊNCIA DAS CÉLULAS – TRONCO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise da expressão dos marcadores envolvidos na origem e pluripotência das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 6.

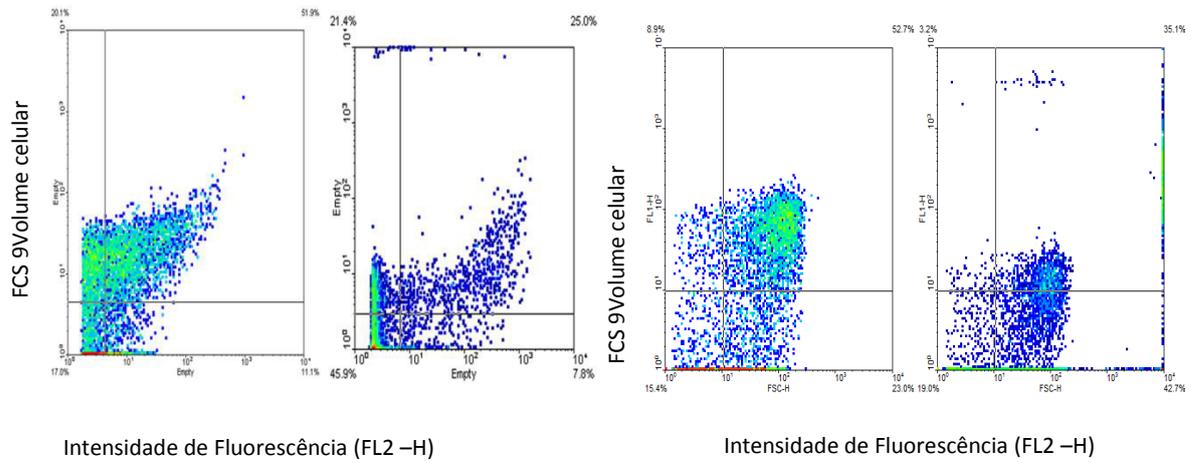
**Tabela 6** – Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino.

Grupo/período	Controle		Diabético	
	15 dg	20 dg	15 dg	20 dg
<b>Marcadores</b>				
<b>STROL -1</b>	48,30	47,40	49,40	46,85
<b>OCT 3/4</b>	54,25	48,90	47,90	53,05
<b>NANOG</b>	52,80	52,15 <sup>a</sup>	50,00	34,00 <sup>b</sup>
<b>CD 115</b>	51,75	53,00	51,60	55,75

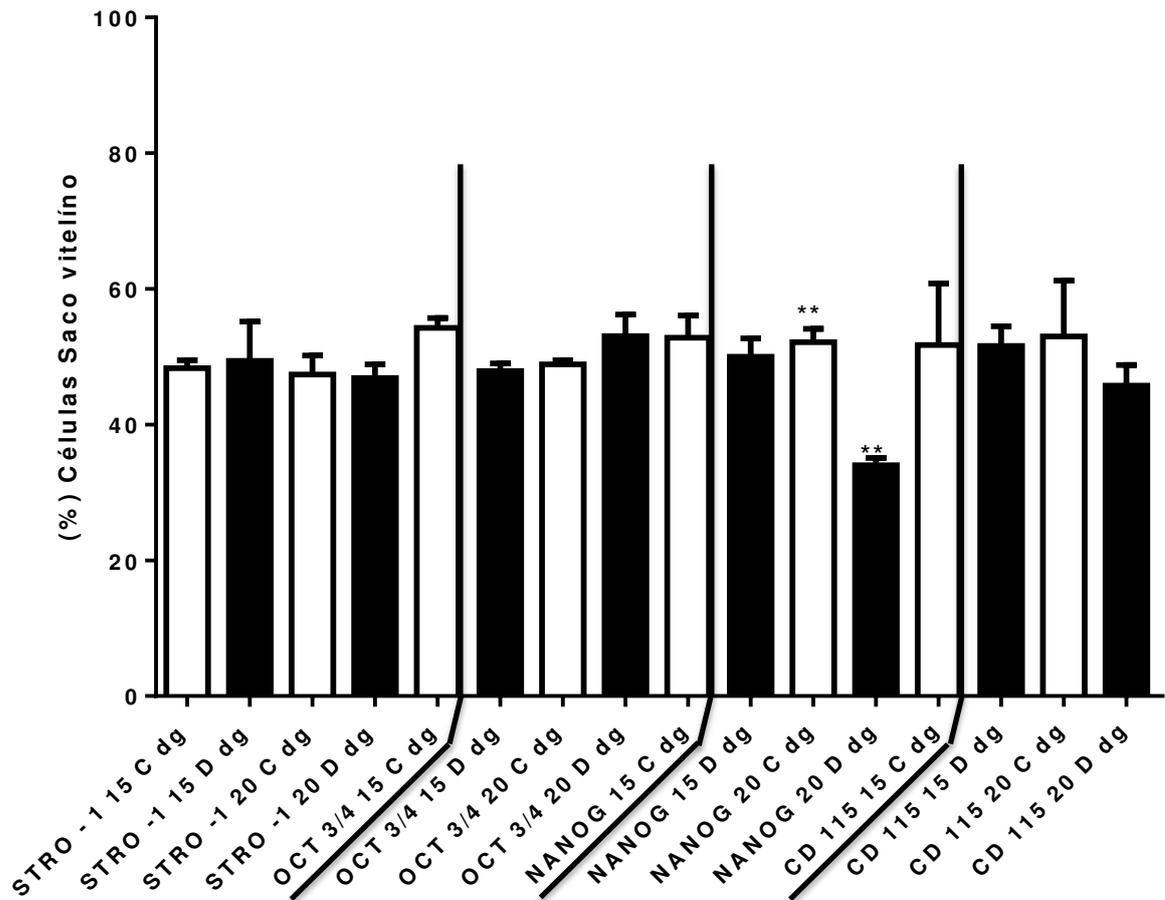
<sup>(a-b)</sup> Diferença significativa  $P < 0,05$

### Grupo controle NANOG 15 / 20 dg

### Grupo Diabético NANOG 15 / 20 dg



**Figura 06** – Expressão dos marcadores envolvidos na pluripotência das células do saco vitelino do tipo Dot plot representativos adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células em atividade nos grupos controle e diabéticos de 15 e 20 dias de experimentação.



**Figura 06** - Representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da proporção da expressão dos marcadores envolvidos na origem e pluripotência das células do Saco Vitelino dos grupos controle e diabéticos de 15 e 20 dias de experimentação.

\*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

## 6.7 EXPRESSÃO DOS MARCADORES RECEPTORES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR GRUPO CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.

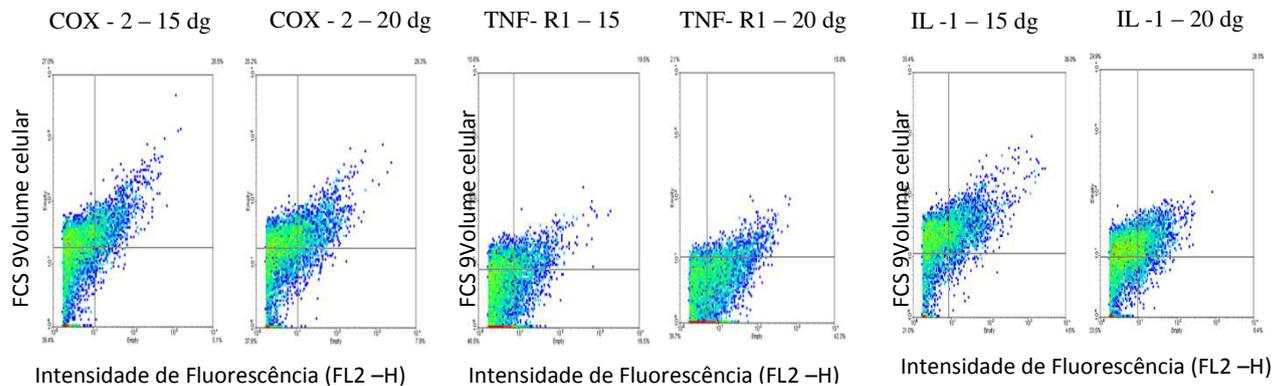
A análise da expressão dos marcadores receptores envolvidos na inflamação e proliferação celular das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 7.

**Tabela 7**– Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino.

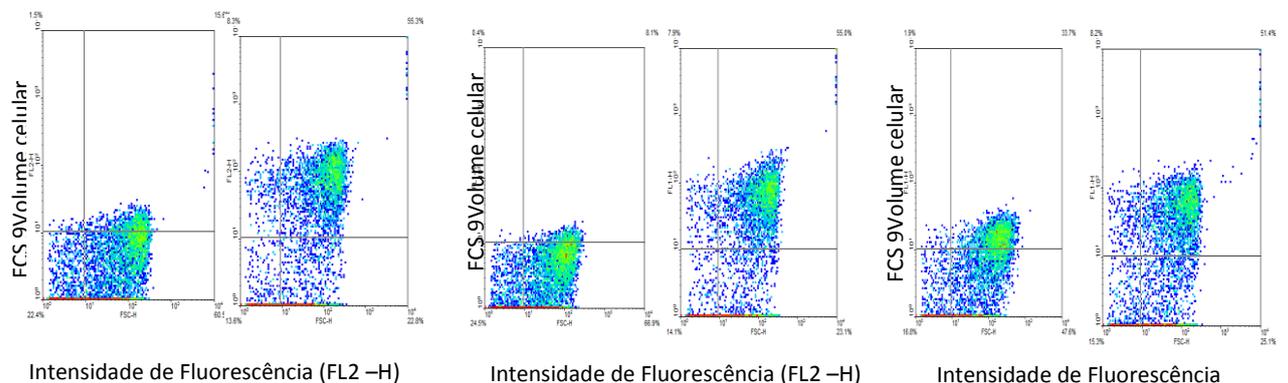
Grupo/período	Controle		Diabético	
	15 dg	20 dg	15 dg	20 dg
<b>COX -2</b>	24,30	25,25 <sup>a</sup>	21,55	57,00 <sup>b</sup>
<b>TNF –R1</b>	15,35	18,75 <sup>c</sup>	12,35	52,50 <sup>d</sup>
<b>IL -1</b>	32,90	30,05 <sup>e</sup>	36,80	52,35 <sup>f</sup>

(a-b, c- d, e -f) Diferença significativa P < 0,05

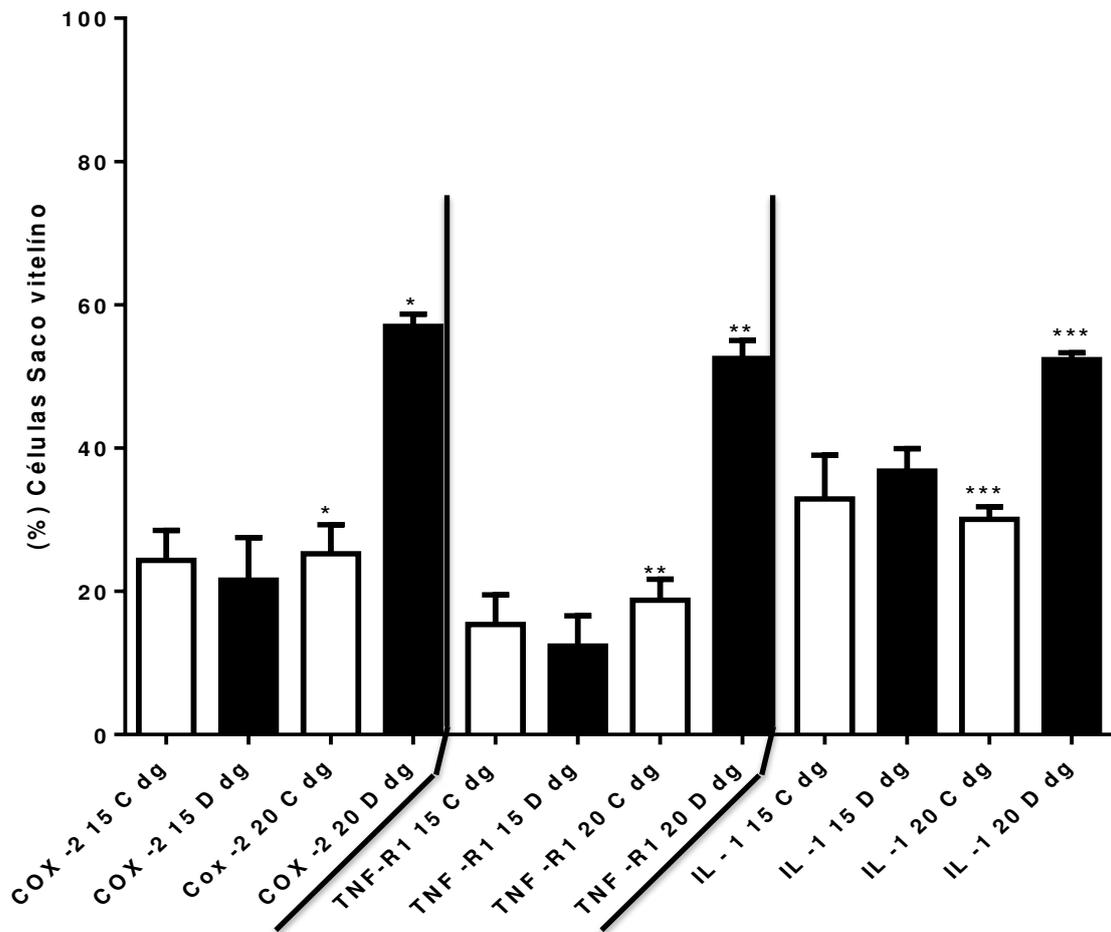
### Controle



### Diabético



**Figura 07** – Expressão dos marcadores envolvidos inflamação e proliferação celular das células do saco vitelino do tipo Dot plot representativos adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células em atividade nos grupos controle e diabéticos de 15 e 20 dias de experimentação.



**Figura 07** - Representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da proporção da expressão dos marcadores receptores envolvidos na inflamação e proliferação celular das células do Saco Vitelino dos grupos controle e diabéticos de 15 e 20 dias de experimentação. \*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

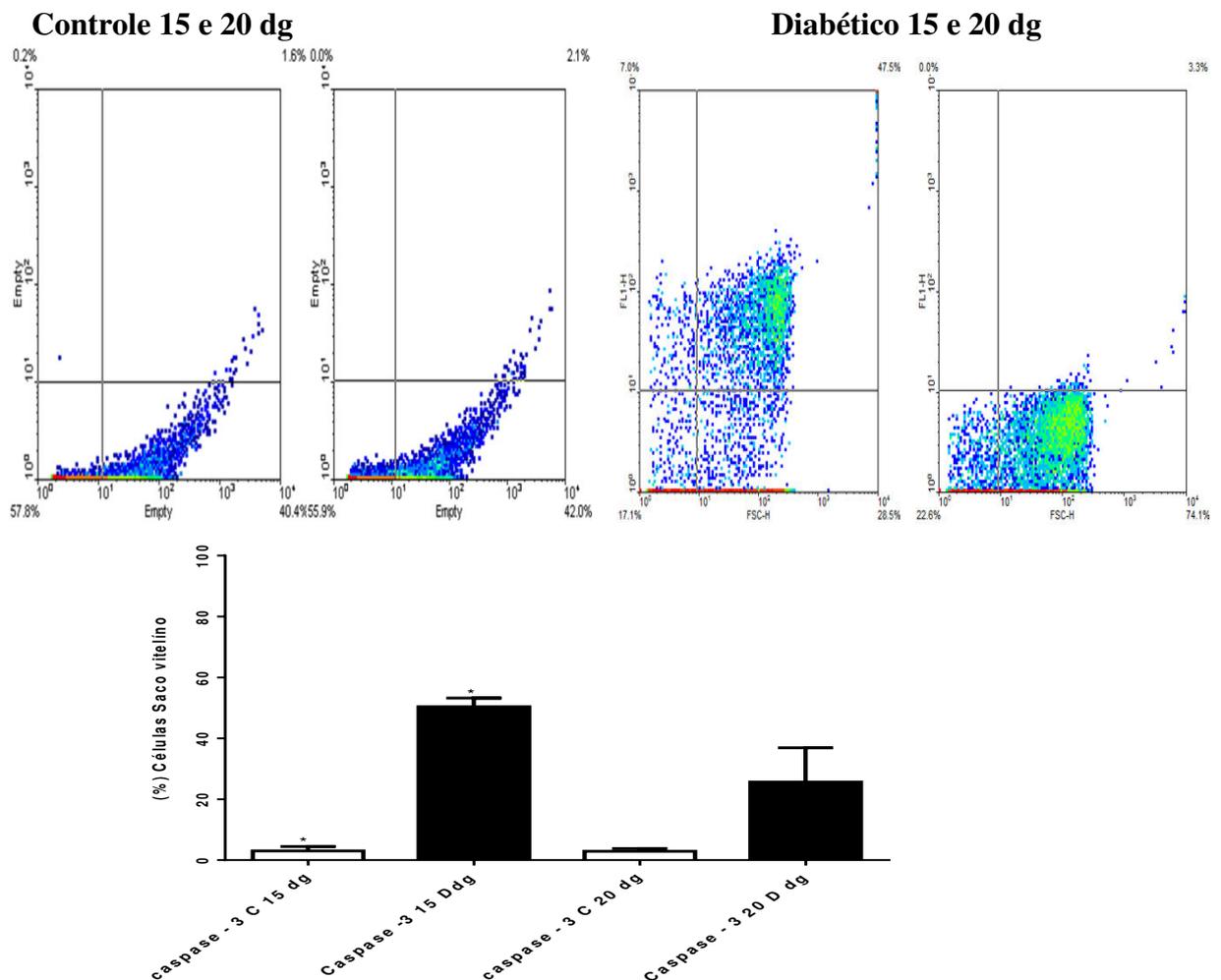
## 6.8 EXPRESSÃO DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NA MORTE CELULAR DOS GRUPOS CONTROLE E DIABÉTICO DETERMINADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.

A análise da expressão dos marcadores envolvidos na morte celular das células do saco vitelino determinados por citometria de fluxo. As médias dos grupos controle e diabético, SVC e SVD respectivamente, aos 15 e 20 dgs estão expressos na tabela 8.

**Tabela 8**– Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando expressão dos marcadores envolvidos na migração celular grupo controle e Diabético das células do saco vitelino.

Grupo/período	Controle		Diabético	
	15 dg	20 dg	15 dg	20 dg
<b>Caspase -3</b>	3,050 <sup>a</sup>	2,950 <sup>b, c</sup>	50,35 <sup>a</sup>	25,65 <sup>c</sup>

Diferença significativa  $P < 0,05$



**Figura 08** – Expressão dos marcadores envolvidos na morte celular das células do saco vitelino nos grupos controle e diabéticos de 15 dg e 20dg. Acima gráficos do tipo Dot plot adquiridos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células que expressam caspase-3. Abaixo, gráfico representando a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da proporção da expressão dos marcadores envolvidos na morte celular. \*Diferença estatística entre os grupos obtida pelo teste de variância de ANOVA seguido pelo teste múltiplo de Tukey-Compare. Fonte: Santos, – JRA (2013).

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou as características das células pluripotentes do saco vitelino de ratas prenhes diabéticas aos 15º e 20º dias de gestação em comparação com o mesmo tipo celular oriundo de ratas prenhes controle. Considerou-se animal controle aquele que não sofreu nenhuma indução ou apresentou alteração sistêmica. As análises foram realizadas por citometria de fluxo que permite-nos mensurar por meio de parâmetros de fluorescências a atividade das células presentes no saco vitelino em animal controle e quando submetidas ao processo patológico do diabetes.

As características das células pluripotentes do saco vitelino (grupos controle – SVC e diabéticos – SVD) foram analisadas e interpretadas em relação ao seu potencial metabólico mitocondrial, as relações de apoptose e cinética de crescimento celular durante os períodos gestacionais (15º e 20º dg) de embriões de ratas Wistar.

Para melhor entendimento das análises dos resultados, a discussão foi dividida em itens à semelhança do capítulo de resultados. Vale a pena salientar que após a discussão de cada resultado, será apresentado a inter-relação dos resultados entre si e que servem de base para a conclusão do presente estudo.

### 7.1 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A análise da atividade mitocondrial das células do saco vitelino em animal controle e diabético aos 15º dg demonstrou alta atividade (92,84 %) e (62,10%), respectivamente. Quando efetuamos a mesma análise aos 20ºdg, observamos diferença significativa quando comparamos o grupo controle (1,890 %) ao grupo diabético (38,04 %).

Os altos índices encontrados em ambos os grupos aos 15ºdg e no grupo controle aos 20ºdg sugerem uma atividade favorável para o desenvolvimento embrionário conforme relatado por TARAZONA, et al., 2006. No entanto, nossos resultados para o grupo diabético ao 20º dg sugerem uma atividade desfavorável ao desenvolvimento embrionário devido ao baixo resultado encontrado.

Quando a análise dos resultados reflete sobre o percentual de inatividade celular, observamos diferenças significativas sempre que comparamos o grupo diabético ao grupo controle tanto aos 15º dg quanto aos 20º dg. Destaca-se ainda que o maior índice de inatividade celular foi observado para o grupo diabético aos 20º dg (Gráfico 1).

Deste modo, podemos observar que o diabetes interferiu negativamente na atividade mitocondrial das células pluripotentes do saco vitelino, uma vez que o baixo índice de atividade mitocondrial foi compensado pelo alto índice de inatividade. Esta interferência sobre a atividade mitocondrial pode estar relacionada a desregulação da permeabilidade, integridade das mitocôndrias, liberação de citocromo-c e ativação da apoptose e diminuição da capacidade proliferativa conforme descrito na literatura (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; DESAGHER; MARTINOU, 2000; PERKINS; BOSSY-WETZEL; ELLISMAN, 2009; OLIVEIRA, 2010, ULIVIERI, 2010).

A liberação de caspases, ativação da apoptose e diminuição da capacidade proliferativa serão discutidos em capítulo pertinente a cada análise destes resultados.

## 7.2 CASPASE

Nossos resultados demonstram que a caspase-3 mostrou-se um marcador importante na fase inicial de gestação como observado no grupo diabético ao 15º dg (50,35%) quando comparado ao grupo controle (3,050%) (Gráfico 8). A maior expressão do grupo diabético pode estar relacionada a uma expressiva involução do saco vitelino, uma vez que a apoptose pode estar relacionada ao perfil metabólico ocasionado pelo diabetes que leva a um perfil de morte celular mais lenta e também depende das alterações da integridade e função mitocondrial (SUSIN et al., 1999).

Além do mais, a concentração da apoptose pode apresentar uma relação com a expressão da fase de síntese e G2M no ciclo celular, o que demonstra que o saco vitelino involui pela perda da atividade celular no metabolismo e a diminui a função que desempenha no desenvolvimento do embrião no início do terceiro trimestre de gestação, que pode ser associado a maior demanda de controle realizada pela placenta (LANGMANN, 2008; MOORE PERSAUD, 2008).

Destacamos ainda que o grupo diabético ao 20º dg apresenta menor índice de marcação para caspase, o que pode estar relacionado ao máximo grau de involução do saco vitelino, uma vez que a involução do mesmo não é total, ou seja, o saco vitelino após a involução permanece ativo como anexo embrionário, sendo também importante para a formação de estruturas embrionárias, tais como formar o divertículo do alantoide que contribui com a formação do intestino posterior e dos gonócitos na formação dos cordões de células progenitoras (LANGMANN, 2008; MOORE PERSAUD, 2008).

### 7.3 CICLO CELULAR E PLOIDIA

Durante a gestação, vários mecanismos especializados estão envolvidos no desenvolvimento embrionário entre estes o ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) que determinam a atividade proliferativa e a apoptose que regula a morte celular.

Os resultados obtidos pela análise realizada por citometria de fluxo indicou variações na proporção da população de células com atividade proliferativa e apoptose nos diferentes grupos controle e diabéticos. Em todos os grupos encontramos uma grande proporção de células em estado de quiescência (G1), grupo controle (29,67% / 15dg e 62,17 % / 20dg) e grupo diabético (29,99 % / 15dg e 59,99 % / 20dg).

Ao analisar-se a fase G2/M aos 15 dias de gestação no grupo diabético foi detectado um aumento no número de células nesta fase, indicando a parada da capacidade proliferativa ou de progressão no ciclo celular, sendo que a partir deste ponto a célula pode responder ao estímulo proliferativo tanto para a próxima fase de proliferação ou de morte celular.

Estes resultados corroboram com as descrições de Hoffmann e Schuler, 2002; Boss et al., 2003; Facciotti et al., 2009, que correlacionam o aumento na proliferação celular próximo ao final da gestação á nutrição do feto, pois a medida que a gestação avança e a demanda fetal aumenta, as células entram em proliferação para serem capazes de produzir diversas substancias requeridas pelo feto. Este resultado pode demonstra que o diabetes passar a ser prejudicial nos últimos períodos da gestação, pois como observado no grupo diabético tratado 20 dg ocorre uma expressiva diminuição da fase G2/M demonstrando uma parada do ciclo celular, retardando assim a progressão do ciclo celular no ponto de checagem da Fase G1 ou na indução da apoptose nas células.

Este prejuízo causado pelo diabetes pode prover tempo para o reparo do DNA e para o reparo das lesões que seriam posteriormente amplificadas na fase S do ciclo celular. Esses resultados coincidem com o estudo publicado por Andrews et al. (1992) ao estudar o ciclo celular de células sanguíneas do saco vitelino de embriões de ratas observou uma diminuição na fase S do ciclo celular indicando uma parada na capacidade proliferativa e demora na regulação que normalmente ocorre nas fases G0/G1 e G2/M de tecidos, células maduras e linhagens celulares em cultura (O'FARRELL, P. et al., 1989).

Ainda assim no nosso estudo ao analisarmos o ciclo celular o grupo diabéticos 15° dg apesar do aumento da atividade na fase G2M, e um aumento da atividade apoptótica em comparação com o grupo diabéticos com 20 dg. O grupo diabético 20 dg demonstra que o

diabetes em idades gestacional avançadas diminui a potencialidade da fase S em replicar o DNA e estaciona a fase G2/M levando a uma parada da capacidade proliferativa.

A expressão demonstrada nos grupos diabéticos com 15° e 20° dg indica uma diminuição da capacidade proliferativa nas células do saco vitelino, corroborando com os resultados da expressão do marcador CD, 90, CD 44, NANOG, desta maneira podemos afirmar que quanto maior a idade gestacional menor é a capacidade de proliferação celular do saco vitelino em diabéticos.

Para tanto PERES et al., (2009), KISS et al., (2009) ao estudar as alterações metabólicas causadas pelo diabetes demonstraram que essa patologia pode prejudicar o processo de ciclo celular, levando a célula a processo de divisões inadequadas.

Riveros, (2009) afirma que esses distúrbios metabólicos podem ser entendidos por processos denominados de citocinese ou senescência. Corroborando com nosso estudo ao demonstramos que durante o processo de divisão celular em sua ploidia as célula do Saco vitelino do grupo diabético com 20 dg, apresentou uma expressiva diminuição do número de células aneuplóides (2,590%), esse achado pode ser explicado pelo diminuição da fase G2M do ciclo celular o que pode sugerir que próximo ao nascimento do embrião em situações hiperglicêmicas a diminuição da capacidade proliferativa da célula pode interferir na formação do embrião (PALIS, J.; MCGRATH; KINGSLEY, 1995; PEREDA, 2001) em comparação aos demais grupos controle 20° dg (35,32%) que apresentou uma capacidade maior em gerar células sem alterações. Esses resultados ainda sugere que apesar da diminuição da proliferação celular próximo ao nascimento do embrião o processo de divisão celular também diminui, podendo assim em idades gestacionais avançadas prejudicar o metabolismo embrionário demonstrando a severidade da doença e as perdas gestacionais.

Foi observado uma maior taxa de apoptose nos animais tratados diabéticos com 15 dg (10,47%) e 20 dg (20,47%) comparado ao grupo controle 15 dg (9,005%) e 20 dg (10,98%), sendo mais significativamente expresso no grupo diabético 20 dg.

O processo de apoptose é marcado por padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e também em diversas patologias (KERR, WYLLE, DURRIE, 1972, MCCONKEY, 1998; MELO, 2000; CURTIN, DONOVAN, COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas da apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças do microambiente, provavelmente induzidas pela injúria tecidual conforme em

nosso estudo pode ser ocasionado pela indução do diabetes (KERR, 1995; VANDERLELIE, et al., 2005). A apoptose é um processo ativo, controlado geneticamente, dependente de energia, síntese de mRNA e de expressão e degradação de proteínas específicas que podem depender de mecanismos dependentes da mitocôndria como a liberação de espécies reativas de oxigênio, que nestes casos podem ser medidos pela expressão da atividade mitocondrial (KERR, 1972; MEGA, 2008).

#### 7.4 MARCADORES

No presente estudo, o contrário do esperado para o estágio de desenvolvimento dos embriões estudados, tais marcadores mantiveram índices diferentes, nas idades gestacionais analisadas. Ao analisar por citometria de fluxo observamos sua expressão em diferentes períodos gestacionais.

Ao investigamos os marcadores envolvidos na formação dos vasos observamos que o CD 34 que atua na formação dos vasos apresentava-se significativamente diferentes ao do receptor do VEGF-R1. O VEGF- R1 é um marcador celular que encontra-se criticamente envolvido na formação do sistema vascular através da regulação do crescimento e sobrevivência dos vasos sanguíneos (BREIER, 2000).

O VEGF-R1 parece ser um dos mais importantes na família, atua como um elemento regulador da angiogênese temporária, sendo produzido de modo parácrino pela endoderme (RISAU; FLAMME, 1995; NICO et al., 2001; KÖHN-LUQUE et al., 2011).

Este fator de crescimento é importante para um desenvolvimento normal da vasculogênese e angiogênese no saco vitelino sendo assim observado, em nossos estudo ser expresso tanto nos grupos controle com 15 dg (53,74%) e 20 (59,30) dg quanto no grupo diabéticos com 15 dg (53,25%) e 20 (55,70) dg, apesar de não apresenta estatisticamente significativa, pode-se entender que a presença ativa do VEGF no mesoderme do saco vitelino contribuindo na formação da vascularização vitelino.

A expressão desses marcadores CD34 e VEGF-R1, demonstra possuir um grande potencial angiogênico durante o desenvolvimento embrionário. Porém ao comparamos ao número de formadores no grupo diabético CD 34 15 dg (27,80%) em relação ao número de receptores VEGF –R1 no 20 dg (55,70%) percebe-se que o diabetes é mais prejudicial no início do terço final da gestação da gestação, sendo supostamente evidenciado a dificuldade

que o diabetes pode acarretar nas células em gerar células precursoras de origem células tronco.

Essas alterações também foi analisada por Cheung (1997) ao estudar o VEGF no desenvolvimento embrionário e fetal, afirmando o papel crítico deste fator de crescimento em ratos transgênicos que necessitam de uma cópia do gene do VEGF, estes animais morrem “in útero”, afetados por uma angiogênese aberrante no saco vitelino e no embrião propriamente dito.

Além disso, o processo de involução do saco vitelino produz a inibição do VEGF, assim as demandas metabólicas direcionam a vascularização dos tecidos extra-embrionários para a formação da placenta, que acompanhara o desenvolvimento normal do embrião até o nascimento.

Durante o período gestacional vários fatores pró-inflamatório são expressos para auxiliar no processo inflamatório de expulsão do feto. Ao analisamos a expressão desses marcadores pró-inflamatórios COX -2 TNF-R1, IL -1 no saco vitelino de ratas gestantes controle e diabético percebemos diferentes alterações em ambos os grupos. Ao analisarmos os grupos controle 20 dg e diabéticos 20 dg a expressão desses marcadores mantiveram-se diferentes. No grupo controle 20 dg a expressão do COX-2 de 20 dg (25,25%), TNF -R1 20 dg (18,75%), IL -1 dg (30,05%) encontravam-se diminuída em comparação com o grupo diabético 20 dg que apresentou-se significativamente elevado COX-2 (57,00%), TNF-R1 (52,50%), e IL -1 (52,35%) demonstrando que esta via de expulsão do feto está ativada, podendo ser mediadas por fatores pro-inflamatórios e prostaglandinas (BUDIARDJO et al., 1999; ASHKENAZI, 2002). O aumento da expressão desses marcadores com 20 dg intensifica o processo de involução do saco vitelino em idades gestacionais mais avançadas.

A marcação celular é uma importante ferramenta que define o potencial e a plasticidade característica de uma população celular. Neste sentido, Pessolato (2011) observou uma contradição da literatura em descrever a potencialidade das células-tronco do saco vitelino como pluripotenciais (BEIGUELMAN, 2000; CHO et al., 2006).

As células-tronco pluripotentes são apenas aquelas extraídas da massa celular interna do blastocisto (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004; LINHENG; LI; TING XIE, 2005). Após este estágio as células possuem uma potencialidade mais limitada, uma multipotencialidade (PESSOLATO, 2011).

Portanto, as células vitelinas apesar de serem extraídas de estágios iniciais de desenvolvimento embrionário são consideradas células-tronco adultas (ZAGO; COVAS, 2006; PESSOLATO et al., 2011).

Apesar da inconsistência da literatura em relação ao potencial das células-tronco do saco vitelino, foi possível observar que, mesmo sendo estas células consideradas células-tronco adultas multipotentes pela classificação e consenso geral, as mesmas mantêm níveis consideráveis de marcadores primitivos característicos de pluripotência como no NANOG (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004). O NANOG é um marcador envolvido na pluripotência. Significativamente, as células vitelinas dos embriões de ratos Wistar estudados apresentaram um aumento do marcador NANOG no grupo diabético com 15 dg (52,15%) e uma diminuição desse marcador no grupo diabético de 20 dg (34,00%) no decorrer do desenvolvimento embrionário. Sugerindo que o diabetes é uma patologia que interfere na pluripotência das células além disso, as células vitelinas apresentaram elevadas expressão dos marcadores OCT 3/4 e CD115, embora não estatisticamente significativo neste estudo (MILLAUER et al., 1993; KABRUN et al., 1997; FORRAI; ROBB, 2003; BERTRAND; TRAVER, 2009; LANCRIN et al., 2009).

O marcador de superfície celular Stro-1 é considerado o melhor marcador para células-tronco mesenquimais (KOLF; CHO; TUAN, 2007), porém não é exclusivo para este tipo de célula, uma vez que a determinação de tal tipo celular depende de uma gama de outros fatores de transcrição, bem como de diferenciação e morfológicos.

Estas características reforçam a hipótese de que as células vitelinas contradizem as características moleculares esperadas para outros tipos de células-tronco. Elas apresentam marcadores de um potencial mais amplo de diferenciação que deveriam ter sido perdidos em estágios bem anteriores aos que os mesmos apresentam, segundo a literatura afirma em células humanas.

Talvez este perfil fosse alterado se as mesmas fossem submetidas a condições de cultura, mas não mudaria o fato do saco vitelino ser uma interessante e enigmática fonte de células, com potencial de utilização em diversas áreas de pesquisa.

Assim esses achados sugerem que o diabetes, no entanto caracteriza-se uma fonte de pesquisa importante, pois apresenta um potencial de interferência amplo na proliferação, migração, diferenciação celular, principalmente na indução da apoptose.

Na literatura ainda não existe um consenso visto que esses marcadores podem ser expressos sob diferentes condições. De qualquer forma tem se mostrando bastante, significativo as investigações em torno do processo patológico do diabetes e suas controvérsias em relação às células- tronco.

Diante do que foi exposto fica claro que o diabetes é uma doença que tem demonstrado sua gravidade, sugerindo uma avaliação minuciosa dos distúrbios metabólicos celulares que são desencadeados pela mesma. Além disso, esses resultados suportam a necessidade de uma atuação multidisciplinar no diagnóstico e tratamento e prevenção desta patologia, uma vez que sua incidência e prevalência continuam elevadas.

## 8 CONCLUSÃO

- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão diminuída do marcador formador de migração celular: CD44.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão diminuída do marcador formador envolvido na formação dos vasos e potencial hematopoiético: CD34.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão diminuída do marcador de Pluripotencia: NANOG.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão aumentada do marcador receptor de adesão envolvido na migração celular: CD 90.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão aumentada do marcador receptor de adesão envolvido na formação dos vasos: VEGF-R1.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão aumentada dos marcadores envolvidos na inflamação: TNF-R1, IL-1r, COX -2.
- No saco vitelino de animais diabéticos, há expressão aumentada do marcador de morte celular: Caspase -3.
- O diabetes induz a inatividade mitocondrial.
- O diabetes prejudica a potencialidade das fases do ciclo celular.
- O diabetes leva às alterações significativas na proliferação, diferenciação celular, processo de ploidia celular e induz à apoptose celular.

## REFERÊNCIAS

- AKAZAWA S. Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model *Congenit Anom. Kyoto* v. 45, p. 73–79. 2005
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.32, p 62-67, 2009.
- ANDREWS, J. E.; EBRON-MCCOY, M.; ZUCKER, R. M.; ELSTEIN, K. H.; ROGERS, J. M. In vitro/in vivo comparison of yolk-sac function and embryo development. *Toxicology in Vitro*, v. 6, n. 1, p. 1-6, 1992.
- ARAÚJO J.D.; FILHO J.D.A.; CIORLIN E.; Ruiz M.A.; Ruiz L.P. Greco O.T. Lago M.R.; Ardito R.V.. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. *J. vasc. bras.* v.4 n.4 Porto Alegre, 2005.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 6, p. 420-430, 2002.
- ASSIS NETO, A. C. **Avaliação morfológica da placentação de bovinos de gestação normais e de gestação manipuladas em laboratório. Exame de qualificação.** Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T.C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho –physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*. v. 45. p. 760 – 772, 2010.
- AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. *Stem Cells*, v.14, p. 269 – 1820, 1998.
- BARCELÓ A, AEDO C, RAJPATHAK S et al. **The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean.** Bulletin of the World Health Organization. v.81, p.19-27. 2003
- BARCINSKI, M.A. Apoptosis in Trypanosomatids: Evolutionary and phylogenetic considerations. *Genet. Mol. Biol.*, v.21, n.1, 1998.
- BARCINSKI, M.A.; MOREIRA, M.E.C. Cellular response of protozoan parasites to host-derived cytokines. *Parasitol. Today*, v.10, p.352-355, 1994.
- BARTELMEZ, R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Splanchnologie. Paris: **Vigot Frères**, v. 2, p. 579-605. 1940
- BEIGUELMANN, T.; MOWAT, M. R. A.; JAROLIM, L.; GREENBERG, A. H.; SMITH, I. C. P. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Cell Death Differ*, v. 8, n., p. 219-224, 2000.

BERONE, R. **Anatome compare des mammiferes domestiques. Splanchnologie.** Paris: Bigot Frères. v. 2p.579 – 605 1976

BERTRAND TRAVEL, M.; NARITA, N.; HEIKINHEIMO, M.; PORTER, S. B.; WILSON, D. B. Erythropoiesis and vasculogenesis in embryonic bodies lacking visceral yolk sac endoderm. *Blood*, v. 88, p. 3720-3730, 1996

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

BLONDEL, O., BAILBE, D., PORTHA, B. Insulin resistance in rats with noninsulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) streptozotocin: evidence for reversal following phlorizin treatment. **Metabolism**, v.39, p.787-793, 1990

BOHELER, KENNETH., Wobus, Anna. “Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy.” **Physiological Reviews**. v 85, p. 635–78. 2003

BOSS, W.; BARTELMEZ, G. W. Hematopoiesis in Young human embryos. **The American Journal of Anatomy**, v. 67, p. 21-53, 2003.

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

BRASIL **Ministério da Saúde. Promoção da Saúde:** Cartas 1. de Ottawa, Adelaide, Sundsvall e Santa Fé de Bogotá programa educativo em diabetes.. Brasília, 2011.

BREIER, G. Functions of the VEGF/VEGF Receptor System in the Vascular System. **Semin Thromb Hemost**, v. 26, n. 05, p. 553,560, 2000.

BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. BIOCHEMICAL PATHWAYS OF CASPASE ACTIVATION DURING APOPTOSIS. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 269-290, 1999.

CAPLAN, A. I Mesenchymal stem cell. **Jornal of orthopaedic research**, v.9, p. 642 – 650, 1991.

CAPOBIANCO, E., JAWERBAUM, A., WHITE, V., PUSTOVRH, C., SINNER, D., GONZALEZ, E. T. Elevated levels of endothelin-1 and prostaglandin E2 and their effect on nitric oxide generation in placental tissue from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, p.225-231, 2003.

CARNEY, D. N.; GAZDAR, A. F.; BUNN, P. A., Jr., and Guccion, J. G. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. **Stem Cells**. v 1, p. 149-164, 2006.

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

- CARVALHO, A. C. C. 'Células-tronco: a medicina do futuro'. **Ciência hoje**, v. 29, n. 172, p. 26-31, 2001.
- CARVALHO, R. S.C. A. **Estudo de proliferação e diferenciação de células-troncohematopoéticas provenientes do sangue do cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos**. Tese de doutorado. Obtido via internet: <http://www.teses.usp.br>, acessado em 15/Jan, 2013.
- CAVALCANTI, F.S. Terapia com célula – tronco: esperança ou novo marketing?. **Rev. Bras. Reumatol.** (periódico online) v. 45. p. 4, 2005. Obtivo via internet: [www.scielo.br](http://www.scielo.br).
- CHO, N.X. RYDER, K.D. PAVALKO, F.M. TURNER, C.H. BURR, D.B. QIU, J. DUNCAN, R.L. (Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. **Am J Physiol Cell Physiol** v.278, p989–997. 2000
- CONCEIÇÃO, R. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M.F MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (Agouti paca) e cutia (Dasyprocta aguti). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 253 – 259 2008.
- COURI, C. E. B. Vale à pena usar células-tronco de sangue de cordão umbilical para um potencial tratamento do diabetes tipo. Sociedade Brasileira de Diabetes <http://www.diabetes.org.br> 2012
- COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. Pesquisa com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. **Instituto Fernando Henrique Cardoso**, São Paulo, nov. 2004. Disponível em:<<http://www.camara.gov.br>. Acesso em: 13 jan. 2013
- CURTIN, Z.S ; SILVA,J.C.R, DIAS, J.L.C **Tratado de Animais Selvagens** 1ª ed, São Paulo: ed Roca , p 108-110, 2007
- DEL CARLO, D. J. R. Células-tronco: Células da esperança: medicina regenerativa. **Revista CFMV - Brasília/DF - Ano XI- NQ35** Maio/Junho/Julho/Agosto de 2005
- DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J.-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-377, 2000.
- DOCHERTY, S. M; ILES, R. K; WATHEN, N; CHARD, T. The temporary anatomical structures prominent in the first trimester may be fulfilling exchange functions assigned to the placenta in the second and third trimester. **Human Reproduction**, v.11, p. 1157- 1161, 1996.
- DOETSCHMAN, T.; WILLIAMS, P.; MAEDA, N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. **Dev. Biol.**, v.127, p.224-227, 1988.
- ENDERS, A. C.; WINSATT, W. A.; KING, B. Cytological Development of yolk sac endoderm and protein-absorptive mesothelium in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. **The American Journal of Anatomy**, v. 146, n. 1, p. 1-30, 1976

- ERIKSSON, U., DAHLSTROM, E., LARSSON, K.S., HELLERSTROM, C. Increased incidence of congenital malformations in the offspring of diabetic rats and their prevention by maternal insulin therapy. **Diabetes**, v. 31, p.1-6, 1982
- EVANS, M. J., KAUFMAN, M. H. Expression in the Chick Embryo Area Vasculosa. **The Histochemical Journal**, v. 33, n. 5, p. 283-286, 2001.
- FAJARDO, L. F. The complexity of endothelial cells. A review. **Amer J Clin Pathol**, v. 92, n. 2, p. 241-250, 1989.
- FAN Linni. et al CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma **Published** online 2011 July 29.
- FECHER B, LAKSHMI S, CHEH C Ti, et al., Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v 22, nº5, p 1343-1356, 2009
- FERREIRA, O. A. **Obtenção e caracterização das células do broto hepático de ratos para terapia celular. Dissertação apresentada ao programa de pós –graduação em anatomia animal e silvestres.** Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia da USP. 2011
- FORRAI R, A. J.; CHAILAKHYAN, R.K.; GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell tissue kinet.** v. 20, n.3, p. 263 – 272, 2003.
- FORSBACH-SÁNCHEZ, G., Tamez-Peréz, H.E., Vazquez-Lara, J. Diabetes and pregnancy. **Arch. Med. Res.**, v.36, p.291-92, 2005
- FUCHS, E., J.A. SEGRE. Stem cell: A new lease on life. **Rev Cell**, v.100, p.143-155. , 2000
- FUKUDA, T. Fetal hemopoiesis. Electron microscopic studies on human yolk sac hemopoiesis. **Virchows Archiv B Cell Pathology**, v. 14, n. 1, p. 197-213, 1973.
- GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos.** [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009
- GALDOS, A. C. R.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia biosfera**, Centro científico conhecer – Goiânia, v. 6. n. 11, 2010.
- GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. Embriologia. 2d. Porto Alegre: Artmed, p.13 – 276 2001.
- GEARHART JD GR, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95 p.13726–13731, 1998.
- GITLIN, D; PERRICELLI, A; GITLIN, G.M. Synthesis of alfa fetoproteins by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. **Cancer Research**, v. 32, p.979-982, 1972

- GJORRET, J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, p.234 -279, 2005
- GLOBERSON A.; WOODS, V.; ABEL, L. et al., "In vitro differentiation of mouse embryonic yolk sac cells," **Differentiation**. v. 36, p. 185-193, 1987
- GODIN, I. E.; GARCIA – PORREDO, J. A.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Potencial intraembryonic hemogenic sites at pre – liver stages in the mouse. **Anatomical Embryology (Berl)**, v. 192 p. 435 – 35, 1995.
- GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 5–6, p. 639-647, 2006.
- GONZALES –CRUSSI, F.; ROTH, L. M The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. **Human Pathology**, v.7. 675- 691, 1976
- GRIVICICH1,V; REGNER, A; BRONDANI, A. Apoptosis: Programmed Cell Death. Revista Brasileira de Cancerologia v 53 n°3 p. 335-343, 2007.**
- GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestacional sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 857 – 862, 1998.
- GUSSONI, E., SONEOKA, Y., STRICKLAND C, D., BUZNEY E, A., KHAN M, K., FLINT, A, F., KUNKEL, L, M., MULLIGAN, R,C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, p. 401: 390 -394. 1999
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole., p, 513.2004.
- HARTWEL, H. L., CULOTTI, J. & Reid, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast.) hemopoiesis: Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, p. 51-60, 1986.
- HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 76, p. 407:770-2000
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PERREAU, C. In vitro culture of embryonic disc cells from porcine blastocysts. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.33, p.475-483, 1993.
- HOFFM.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, n. 6299, p. 334-336, 1990.
- HOYES, A. D. The human foetal yolk sac: An ultrastructural study of four specimens. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 99, p. 469-490, 1969
- HU, Karin, et al., Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. **Science** 23 Vol. 300 no. 5623 pp. 1251-1256, May 2004.
- HYTTEL, P. Development of the blood cells, heart and vascular system. In: HYTTEL,

- intestine and yolk sac of the guinea pig. **American Journal of Physiology**, v. 215, p.1468-1477, 1968.
- JANFREDO, T.; BOLLEROT, K.; SUGIYAMA, D. G.; DREVON, C.; Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **International Journal Developmental Biology**, v. 49, p. 269 – 277, 2005.
- JOLLIE W.P. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. **Teratology**, v. 41, pp. 361–38, 1990
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- KARPOWICZ, P. ; WILLAIME-MORAWEK S;BALENCI, L. E-Cadherin Regulates Neural Stem Cell Self-Renewal. **The Journal of Neuroscience**. v 29, p. 3896, 2004.
- KATAYAMA, I; KAYANO, H. Images in clinical medicine. Yolk sac with blood Island. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 617, 1999.
- KAUFMANN, P. DAVIDOFF, M. The guinea pig placenta. **Advances in Anatomy, Embriology, and Cell Biology**, v. 53, p. 1 -91, 1977.
- KERR, G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. **Current Opinion in cell Biology**, v 7: 862 -869, 1995
- KERR, JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. v. 6, p. 239-57. 1972
- KERVAN, A., GUILLAUME, M., JOST, A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. **Diabetologia**, v.15, p.387-393, 1978.
- KIERZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia Celular. Uma introdução a patologia**. Rio de Janeiro, Elsevier. p. 677, 2008.
- KING, B. F. Comparative anatomy of the placental barrier. **Biblioteca Anatomica (Karger Basel)** n. 22, p. 13 -18, 1982
- KISS, A. C. I., LIMA, P. H. O., SINZATO, Y. K., TAKAKU, M., TAKENO, M. A., RUDGE, M. V. C., DAMASCENO, D. C. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.19, p.1-7, 2009.
- KODAMA, T., IWASE, M., NUNOI, K., MAKI, Y., YOSHINARI, M., FUJISHIMA, M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.20, p.183-9, 1993.
- KÖHN-LUQUE, A.; DE BACK, W.; STARRUß, J.; MATTIOTTI, A.; DEUTSCH, A.; PÉREZ-POMARES, J. M.; HERRERO, M. A. Early Embryonic Vascular Patterning by Matrix-Mediated Paracrine Signalling: A Mathematical Model Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24175, 2011.

KOLF, C.; CHO, E.; TUAN, R. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KRAUSE D. S.; NEIL D. T. et al., Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. **Cell**. v 105, n°3, p. 369–377, 1996

**LAMES, C. LORSON, J THOMSON, C. et al Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature v.457, p 277-280, January 2008**

LARSEN, J. F. Histology and fine structure of the avascular and vascular yolk sac placenta and the obpalcental giant cells in the rabbit. **American Journal of Anamomy**, v.112, p. 269 – 284, 1963

LATSHAW, W. K. Veterinary desenvolvimento anatomy: a clinical oriented approach. Toronto: **Decker** ,. p. 49 – 47. 1987

LEE, B. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. **Cytotherapy**, v.8 p.599 – 561, 2006.

LENZEN, S.; NAUJOK OF. FRANCINI A. An efficient experimental strategy for mouse embryonic stem cell differentiation and separation of a cytokeratin-19-positive population of insulin-producing cells **Cell Proliferation**. v 41, n° 4, p 607–624, 2008

LERCO, M. M., SPADELLA, C. T., MACHADO, J. L. M., SCHELLINI, S. A., PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras. [serial online]**, v. 18, p.132-142, 2003.

**LERI, A; BOLLI, R. Life and Death of Cardiac Stem Cells. Circulation. v. 113, p. 1451-1463, 2004**

**LINGENG L. T; YAO X L; ZHANG C; LIU W. et al. Relationship Between Apoptosis and Differentiation from Human Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells. Journal of Chinese Medical, v. 06 2005**

LIU, C. P; AUERBACH, R. Ontogeny of mune T cells: thymus-regulated development of T cell receptor-bearing cells derived from embryonic yolk sac. **Eur. J. Immun.** 21, 1849-1855. 1991

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201, 2004.

LOCKSHIN, RA, WILLIAMS, CM. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmouths. **J Insect Physiol.** v.10 p.643-49. 1964

LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Células tronco no tratamento e cura do diabetes mellitus. **Ciência e saúde coletiva**, v. 13, n. 1, p. 15-22, 2008.

- MACANARES, F. A. C. **Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2007.
- MACLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. **Nature**, v.14, p. 129-131, 2001.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**. v. 9 p. 153 – 166, 2009.
- MARANGHI F., MACRI C., RICCIARDI, C., STAZI, A.V. Stazi, MANTOVANI A. Evaluation of the placenta: suggestions for a greater role in developmental toxicology. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.444, pp. 129–136, 1998
- MARION, K; MERI F; KYUNGHEE C; CHARLES W; SCOTT R; NEIL K; GORDON K. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. **Nature**. v 386, p 488 – 493, 03 abril, 1997
- MARTIN, G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States**. 78, 7634- 7638. 1981.
- MATA, A. D. et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. **Mol Cell Biochem**. v. 42. p. 137 – 261 , 2004.
- MAYHEW, T. M. Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. **Diabetologia**, v.45, p.1434-9, 2002.
- MAYHEW, T. M., CHARNOCK-JONES, D. S., KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, p.127-39, 2004.
- MCKAY R. Stem cells - hype and hope. **Nature**, v.6, n.7, p.361-364, 2000.
- MEDVINSKY, A. L., SAMOYLINA, N. L., MULLER, A. M. and DZIERZAK, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. **Nature** 364, 64-67. 1993
- MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000
- MIGLIACCIO, G.; MIGLIACCIO, A. R.; PETTI, S.; MAVILIO, F.; RUSSO, G.; MIGLINO, M. A. O enigma vitelínico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 6, p. 86, dez. 2009.
- MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. R.; MILLAUER R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** Vol. 78, No. 12, pp. 7634-7638, December 1993

MITSUI, E. A.; ALPUCHE – ARANDA, C.M.; DORS, M.; CLARK, A.E.; BADER, M. W.; MILLER, S.I.; ADEREM, A. Cytoplasmic flagellin activates caspase -1 and secretion of interleukin 1  $\beta$  via lpad. **Nature Immunology**, v.7, p. 569 -575, 2003.

MONIE, I. W. Comparative development of the nervous, respiratory, and cardiovascular systems. **Environ Healt Perspect**, v. 18, p. 55 -60, 2006.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N., SHIOTA, K. Color atlas of clinical embryology. Chater 1 “ The first two weeks of human development”. W. B. Saunders Company. Philadelphia, London. **New York, St. Louiz, Sidney**, Toronto, pag.: 1-12. 2000.

MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the haemotopoietic system: yolk sacorigin of in vivo colony forming cells in developing mouse embryo, **British Journal ofHaematology**. v. 18, p. 279-296, 1970.

MOSSMAN, H. W. **Contributions to embryology**. Washington: Carnegie Institution, , p. 247. 1937

MOSSMAN, H.W.: **Vertebrate Fetal Membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press 1987

**MS-GOVERNO LANÇA REDE BANCOS PÚBLICOS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**. 2004. Disponível em <http://portal.saude.gov.br>

MULLER-SIEBURG, C.E., WHITLOCK, C.A., WEISSMAN, I.L. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-**lo hematopoietic stem cell**. *Cell*, 44: 653-662. 1986

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v.69, p.1159-1164, 2008.

NAKAJIMA, K. **Avaliação do ciclo celular de células tronco progenitora hematopoiéticas da células óssea de camundongos**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciência farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2010.

NICO N, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 2001

NICO, B.; VACCA, A.; DE GIORGIS, M.; RONCALI, L.; RIBATTI, D. Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 153 **Experimental Morphology**, v. 33, n. 2, p.435-446, 1975

NING, H, et al Mesenchymal Stem Cell Marker Stro-1 is a 75kd Endothelial Antigen. **Biochem Biophys Res Commun**. v.23; p.413(2): 353–357. September 2011

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

- GALES, F. F.; BELTRAN, E.; GONZÁLEZ, F. Morphological changes of the secondary human yolk sac early pregnancy wastage. In: **Human yolk sac and yolk sac tumor**. Springer-Verlag, Heildelberg. p. 174-194. 1993
- NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, n., p. 71-78, 2000.
- NURSE, P. et al. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Gen. Genet.** v. **146**, p. **167–178** 1976.
- O'FARRELL, P.; EDGAR, B.; LAKICH, D.; LEHNER, C. Directing cell division during development. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 635-640, 1989.
- OH, W., GELARDI, N. L., CHA, C. J. The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. **Pediatr. Res.**, v.29, p.606-610, 1991.
- OH, W., GELARDI, N. L., CHA, C.J. Maternal hyperglycemia in pregnant rats: its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. **Metabolism**, v. 37, p.1146-1151, 1988.
- OKADA H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. v.4, p.592-603. 2004
- OLIVEIRA, L. A. C.; SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L. Conceito e aplicações de células tronco em medicina regenerativa: uma revisão. **RUBS**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 32-42, abr./jun. 2006
- ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol Lett**, v. 149, p. 19-23, 2004
- PALIS, J.; MCGRATH, K. E.; KINGSLEY, P. D. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 156-163, 1995.
- PALIS, J.; YODER, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 8, p. 927-936, 2001.
- PALOMAR-MORALES M.; BAIZA L. A.; VERDÍN L. T.; RAMOS R. R.; LOZANO M. A.; MÉNDEZ J. D.; Fetal Development in Alloxan-Treated Rats. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 659 – 665, 1998
- PERREDA, J. Significado morfofuncional del saco vitelino durante el periodo embrionario humano: revisión del problema e impacto en clínica. **Contribuciones Científicas y Tecnológicas, Area Ciencias Médicas**, v., n. 128, p. 25-47, 2001.
- PERREDA, J.; MONGE, J. I.; NIIMI, GEN. Two different pathways for the transport of primitive and definitive blood cells from the yolk sac to the embryo in humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 8, p. 803-809, 2010
- PEREIRA, L.V. **Clonagem: fatos & mitos**. São Paulo, ed. Moderna, 2008.
- PERES, L.C., RIBEIRO, C. N. de M., GUTIERREZ, C.M., FOSS, M.C. Effect of alloxan-induced diabetes mellitus and ethanol on pregnancy outcome in mice. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.45, p. 471-480, 2009

- PERKINS, G.; BOSSY-WETZEL, E.; ELLISMAN, M. H. New insights into mitochondrial structure during cell death. **Experimental Neurology**, v. 218, n. 2, p. 183-192, 2009.
- PERREDA, J. MOTTA, P. M. New advances in human embryology: morfofuncional relationship between the embryo and the yolk sac. **Medical Electron Microscopy**, v. 32, p. 67 – 78, 1999.
- PERREDA, J.; CERISOLA, H.; POZO, J. El saco vitelino humano: superficies endodérmica y mesotelial analizadas por microscopia electronica de barrido. **Anales de Anatomia Normal**, v.6 p.90 -92, 1998
- PERREIRA, V. L. A importancia do uso das células-tronco para a saúde publica. **Rev. Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 13 nº 01 Rio de Janeiro. Jan/Fev, 2008
- PESSOLATO, A. G. T. **Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (Ovis aries)**. FMVZ, universidade de São Paulo, São Paulo,. 153 p. 2011
- PIZA, W. A.; PUSSI, F. D. Células tronco: o alfa e o omega. **Arq. cons. region. med. do Pr.** v. 22, n. 87, p. 57-75, 2012.
- PORTAL SAÚDE. **Células-tronco**: Brasil realiza maior estudo do mundo com 1.200 pacientes. 2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal>: Acesso 13 de novembro, 2012
- PORTHA, B., KERGOAT, M. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozocin diabetes induced in the newborn rat. **Diabetes**, v.34, p.574-579, 1985.
- RENFREE, M. B.; HENSLEIGH, H. C.; MC LAREN A. Development changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. **Journal of Embryology** v. 5. p. 115, 1975.
- REUBINOFF, B. E et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* v. 18, p. 399 – 404, 2000.
- RILEY, R.S., MAHIN, E.J. - **Clinical applications of flow cytometry**. ASCP National Meeting. Las Vegas, Nevada, 1988.
- RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 73-91, 1995.
- RIVEROS, A. C. G. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. Dissertação de mestrado (ciências da saúde) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2009.
- RIVEROS, Alvaro Carlos Galdos. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA. **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.6, n.11; p. 1, 2010.
- RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). **Anatomy and Histology and Embryology**, v. 21, p. 324-347, 1992.

- SADLER, T.W. **Embriologia médica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.347. 2005
- SAITO Shin'ichi; SHARLYN J. Mazur; MAUREEN E. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. **Nature Cell Biology** v7,p 165 – 171, 2012.
- SCHAFFER, K. A. The cell cycle: A Review. **Vet. Pathol.** v. 35, p. 461 – 478, 1998.
- SCHWARTZ Z, MELLONIG JT, CARNES DL Jr, De LA FONTAINE J, COCHRAN DL, Dean DD et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J Periodontol** v.67 n° 9 p. 918-26. 2005.
- SHAPIRO, H.M.. Membrane potential estimation by flow cytometry. **Methods.** v.21, p.271-279. 2000.
- SHI, W. K.; HOPKINS, B.; TOMPSON, S.; HEATH, J. K.; LUKE, B. M.; GRAHAM, C. F. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferring by the human foetal yolk sac and other foetal organs. **Journal of Embriology and Experimental Morphology**, v. 85, p. 191 – 206, 1985.
- SICLARI, V.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 1, p. 78, 2010.
- SILVA TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Bol Biotecnol**, p.32-40, 2001.
- SKOMMER, J.; WLODKOWIC, D.; DEPTALA, A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. **Leukemia Research**, v. 31, n. 3, p. 277-286, 2007.
- SOLÁ, S.; PEDRO, T.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, C. M. P. Apoptose: Uma questão de vida ou de morte. **Biologias**, v. 2, n., p. 9, 2005.
- STURM, J.C; RIEHN, R; AUSTIN, R. H. Microfluidic high gradient magnetic cell separation. **Journal of Applied.** v 99 n° 8. 2006
- SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-446, 1999.
- TABER, LA. Biomechanical growth laws for muscle tissue. **J Theor Biol** v.34 p 193, 201, 2000.
- TARAZONA, A. M.; OLIVERA-ANGEL, M.; LENIS, Y. Y. Rol de la mitocondria y el stress oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, n., p. 125-133, 2010.
- TARAZONA, A. M.; RODRÍGUEZ, J. I.; RESTREPO, L. F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2005.

- THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. v 282, p 1145–1147,1998
- THONBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.
- TIEDEMANN, K. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. **Anatomy and Embryology**, v. 158, p. 75-94, 1979.
- TIEDEMANN, K.; MINUTH, W. W. THE PIG YOLK SAC I: Fine structure of the yolk sac. Toronto, v. 155, p. 56 057. 2008
- ULIVIERI, C. Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria. **Tissue and Cell**, v. 42, n. 6, p. 339-347, 2010.
- VANDERLELIE, S., GUAN, K., PICH, U., WOBUS, A, M. The establishment of SSEA -1 ano Oct -4 expressing rat Es cell lines and effects of cytokines of the IL – 6 family on clonal growth. **Experimental Cell Research**, 285, 361 – 373, 2001.
- VATS A, TOLLEY NS, POLAK JM, BUTTERY LDK. Stem cells: sources and applications. **Clin Otolaringol**. v.27, p. 227-234. 2002
- VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell** v. 72 n.14 p.232-242, 2002.
- WANGERS, X. Y.; LAN, Y.; HE,W.Y.; ZHANG, L.; YAO, H.Y.; HOU, C. M.; TONG, Y.; LUI, Y. L.;YANG, G.; LIU, X. D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta – gonad –mesonephoros and yolk sac of human embryos. **Blood**. v. 15, n. 111 (4), p. 2436 – 43, 2004.
- WEISSBERG, P.; QASIM, A. Stem cell therapy for myocardial repair. **Heart**, v. 91, n. 5, p. 696-702, 2005.
- WELBURN, S.C.; BARCINSKI, M.A.; WILLIAMS, G.T. Programmed cell death in Trypanosomatids. **Parasitol. Today**., v.13, p.22-26, 1997.
- WENCESLAU, V. C. **Analise de células mesenquimais do saco vitelino fígado e medula óssea de fetos caninos**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia 2010.
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-53, 2004.
- WITCHI, E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. **Contribution to Embryology, Carnegie Institute**, v. 32, p. 67-80, 1948
- WOBUS, A.M. Potencial of embryonic stem cells. **Mol. Asp. Med.**, v.22, p.149-164, 2004
- WOBUS, A.M.; HOLZHAUSEN, H.; JÄKEL, P.; SCHÖNEICH, J. Characterization of a Embryo-maternal communication in bovine- strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.

WOODING, F.B.F.; FLINT, A.P.F Placentation. In: Wooding, F. B. P.; FLINT,G.E. (ED) **Marshalls Physiology of reproduction**. 4 ed. Chapman and Hall: p.230 – 466. III, London, 2008.

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

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

ZATZ, M. Clonagem e células tronco. **Ciência e Cultura**, v.56, n.3,julho/setembro, 2004.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

**ANEXO I**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeitos do treinamento físico resistido na reatividade vascular de ratos hipertensos", sob coordenação do Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos (protocolo CEPA 02/2010), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 07/05/2010.

São Cristóvão, 12 de maio de 2010

Prof. Dr. Flavia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"  
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE  
49100-000  
Fones: 3212 6661/6606

## ANEXO II

15/04/13

Gmail - Manuscript Submission to PLACENTA: Confirmation



Emerson Fioretto &lt;emmovet.ufs@gmail.com&gt;

**Manuscript Submission to PLACENTA: Confirmation**

↑ mensagem

**Placenta** <plac@elsevier.com>  
Para: emmovet.ufs@gmail.com

15 de abril de 2013 19:17

Apr 15, 2013

Dear Dr. FIORETTO

Manuscript Title: Characterization of undifferentiated pluripotent cells of yolk sac of diabetic rats.  
Other Authors: José Ronaldo A SANTOS, Master; Karine S SOUZA, Undergraduate student; Janete O REIS, Undergraduate student; Priscilla s FARIAS; Ana Leticia S Leite, Undergraduate student; Marlúcia B AIRES, PhD ; Durvanei A MARIA, PhD ; Emerson T FIORETTO, PhD

Thank you for submitting your manuscript "Characterization of undifferentiated pluripotent cells of yolk sac of diabetic rats." to Placenta.

We will be forwarding your manuscript for review by a series of referees. This procedure normally takes four weeks, and we will inform you of our decision regarding your manuscript at this time.

If you have any queries regarding your manuscript during the review process, please log in to Elsevier Editorial System (EES) as an Author for details. You can also check the status of your manuscript at the Placenta editorial manager website.

The EES site is at <http://ees.elsevier.com/plac/>

Yours sincerely,

Editors  
Placenta

**Characterization undifferentiated pluripotent cells of the yolk sac of diabetic rats wistar.**

J.R.A dos Santos<sup>a</sup>, K.S. Souza<sup>b</sup>, P.S. Farias<sup>b</sup>, J. O. Reis<sup>b</sup>, A.L.S. Leite<sup>b</sup>, M.B. Aires<sup>b</sup>, D.A. Maria<sup>c</sup>, E. T. Fioretto<sup>a,b,\*</sup>.

<sup>a</sup> Núcleo de Pós –Graduação em Ciência da Saúde – UFS - Rua Cláudio Batista s/n, Aracaju/SE/Brazil, CEP 49065-000, +5579 21051700.

<sup>b</sup> Departamento de Morfologia - UFS - Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos Av. Marechal Rondon, s/n, São Cristóvão/SE/Brazil, CEP 49100-000 - +5579 21056625

<sup>c</sup> Instituto Butantan – Universidade de São Paulo Brazil Av. Vital Brasil, 1500, São PauloSP/Brazil, CEP 05503-900 - +5511 37267222

**Abstract**

Researches using stem cells have been considered very promising in the treatment of several diseases however pluripotent cell behavior on diabetes condition has been no investigated. We aimed to evaluate proliferative potential, and the characterization of stem cells from yolk sacs obtained from rats in 15 and 20 gd in normal and hyperglycemic conditions using flow cytometry to analyze cell cycle phases, metabolic potential of mitochondrial membrane and the expression of caspase and differentiation markers of stem cells. Diabetes presented a negative influence on mitochondrial activity, demonstrated by the lowest level of mitochondrial activity and the elevated rate of inactivity in diabetic group. This scenario might be associated to permeability deregulation, mitochondrial integrity, cytochrome c release, apoptosis activation and proliferative capacity decreasing. We should claim diabetes might be harmful in the last period of pregnancy, because in diabetic group at 20th gd we observed an intensively decreasing in G2/M phase what might be explained by a cell cycle stopping associated to a reduction in the cell cycle progression or an apoptosis induction. In our study, results analysis has lead us to suggest that diabetes induces changes in the microenvironment, inducing over expression of caspase and interfering in mitochondria activity. Diabetes interfere in cell pluripotency expressed by a decrease expression in diabetic at 20 gd however, demonstrated equilibrated expression of CD115 and OCT 3/4 involved in pluripotency. Our findings suggest that diabetes played a potential interference on proliferation, migration, cell differentiation, induces to a mitochondrial inactivity, interfere on cell cycle and induct to apoptosis.

**Keywords:** Diabetes, Stem Cell, Yolk sac, Embryonic Development, Gestation.

\*Corresponding Author:

Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos Av. Marechal Rondon, s/n, São Cristóvão/SE/Brazil, CEP  
49100-000 - +5579 21056625 fioretto.ufs@gmail.com

## 1. Introduction

Diabetes is a disease that interferes in cell metabolism, moreover, during gestational embryonic period. Diabetes can develop metabolic disturbs in endothelial proliferation and in the vascular growth compromising embryonic development [1] and [2]. In some cell types, chronic hyperglycemia stimulates an increase in glucose uptake and may cause changes in metabolic pathways [3]. During pregnancy, diabetes can be classified as: gestational diabetes (GDM, defined as any glucose intolerance detected between 24-28 weeks of gestation) and pre-established clinical diabetes (women previously diagnosed with Diabetes Mellitus type 1 or 2). Which can be related to newborn morbidity and mortality [4] and [5]. (It has been widely discussed that chronic hyperglycemia triggers metabolic disturbances which can interfere in endothelial proliferation and vascular growth in a wide range of tissues [4].

Stem cells can be classified by their origin in embryonic, fetal or adult stems cell, which presents processes of differentiation into specialized types of cells and long-term self-renewal [6] both have lead them to be considered as a very promising source for cell therapy for some diseases as Parkinson, Diabetes and Cardiac insufficiency [7].

Yolk sac is a source of stem cells populations related to mesenchymal, endothelial and blood formation [8]. It also performs many functions during gestational development, such as embryo nutrition, protein synthesis and phagocytic activity being important during the first half of pregnancy [9]. Yolk sac reaches its major development around 10<sup>th</sup> gestational day (gd) until the establishment of the allantochorion circulation [10] and [11], its regression, in rats, begins around the second or third gestational period [12].

Stem cell proliferation, differentiation and cell death are controlled by a series of events which can be investigated by the usage of cell markers. Cell proliferation is a very highly-coordinated and regulated complex process which regulates signaling process and the passages between G1, S, G2, M [13]. Researchers have shown that various pathologies, such as diabetes can cause the emergence of mutations and aberrations interfere directly in the mechanisms involved in the cell cycle [14], [15] and [16]. Normal and abnormal cell numbers and populations might be regulated by controlling the processes of cell death and apoptosis [17] and [18].

There are a wide variety of transcription factors essential for the maintenance and revitalization of the stages of stem cells [6]. These factors play an essential role in the maintenance of cell types differentiation as Oct 3/4 [19], in the self-renewal reprogramming and cell pluripotency establishment as POU5F1, SOX2 and NANOG [20], and mesenchymal

specific factors as Stro-1 and CD 90 which is involved in cell adhesion and migration [21]. Additionally, CD 117 is related to hematopoietic stem cells, CD34 is associated to cell adhesion [22] and cell interactions and migration [6] and VEGF-R1 acts in the formation of blood vessels and hematopoietic tissues [23].

The current study aimed to evaluate: 1) proliferation potential, 2) energetic mitochondrial membrane potential, 3) cell markers expressions for cell differentiation, 4) cell cycle profile and 5) ploidy of pluripotents cells of yolk sac obtained from rats in 15 and 20 day of gestation in normal and hyperglycemic conditions.

## **2. MaterialS and Methods**

This study was approved by the Ethics and Animal Research (CEPA) Federal University of Sergipe/Brazil - CEPA No. 86/11.

### **2.1 Animals and experimental procedure.**

Twenty-five female and 05 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 200-250g were used in the study. Animals were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Sergipe. All rats were allowed free access to standard rat laboratory diet (Labina, Purina ®, Paulínia-SP, Brazil) and tap water and were maintained on a 12:12h light/dark cycle. Five females and one male were housed overnight in one cage to mate and sperm-positive vaginal smear was considered as gestational day 1 (1gd).

Diabetes was induced in the diabetic group on 8gd, through the caudal vein by a single injection of alloxan monohydrate (37mg/kg, i.v) in saline solution, after 12 hours of starvation. Animals in the control group received identical volume of saline solution. Blood glucose concentration was measured at 8gd, 10gd and at 15gd. Animals exhibiting blood glucose level higher than 200mg/dl at 10gd (Accu-Chek Performa test strips, Roche Diagnostic) were considered to be diabetic. Maternal weight was taken on 1gd, 8gd and 15gd. On 15gd and 20gd, control and diabetic animals were anesthetized with xylazine (20mg/kg) and ketamine (80mg/kg), exsanguinated and laparotomized to remove the uterine horns.

### **2.2 Yolk Sac stem cells sampling**

Five fetus and five placentas were collected from five diabetic animals and five control animals at 15gd and 20gd. Each placenta were dissected for yolk sac isolation and kept on ice. Material was mechanically dissociated with saline solution, filtered through 25mm filters and the cell suspension kept on 1 mL of freezing solution at -70°C.

### **2.3 Analysis of Cycle Stages in Cell Populations by Flow Cytometry**

A total of 16 samples in both groups was analyzed in flow cytometer (FACS Calibur, Beckton Dickson) to determine cell cycle phases. Samples were separated from the ice and

thawed at room temperature, being added to each microtube 500 uL of Fac's Flow buffer and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes. After this period, the supernatant was discarded and re-suspended in 200µl Fac's Flow buffer [24], following the addition of 10µl of propidium iodide (PI) (18µg/ml) for 20 minutes in order to distinguish apoptotic cells from necrotic cells. Samples were centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes, supernatant was discarded and re-suspended in 200 µl Fac's Flow buffer. Samples were stored on ice for transport and analysis performed on the flow cytometer. The results of the cell cycle are expressed as mean percentage of cells in different phases of the cell cycle: DNA fragmented sub - G1 (apoptosis), quiescent G0/G1 phase, synthesis phase - Phase S and G2 / M.

#### **2.4 Mitochondrial Membrane Potential**

Samples for mitochondrial membrane potential were treated as described above. Singular adaptation was performed in order to use rhodamine123 probe. After centrifugation, the solution was discarded and cells were re-suspended in 200 µl Fac's Flow buffer and added 5 µl rhodamine 123 probe diluted in dimethyl sulfoxide (5ug/ml) and incubated in a CO<sub>2</sub> (5%) at 37 for 30 minutes. Rhodamine probe fluorescence intensity was evaluated under FL-1H fluorescence channel and results were analyzed by WinMDI 2.9 software.

#### **2.5 Expression of markers of maturation, differentiation of stem cells.**

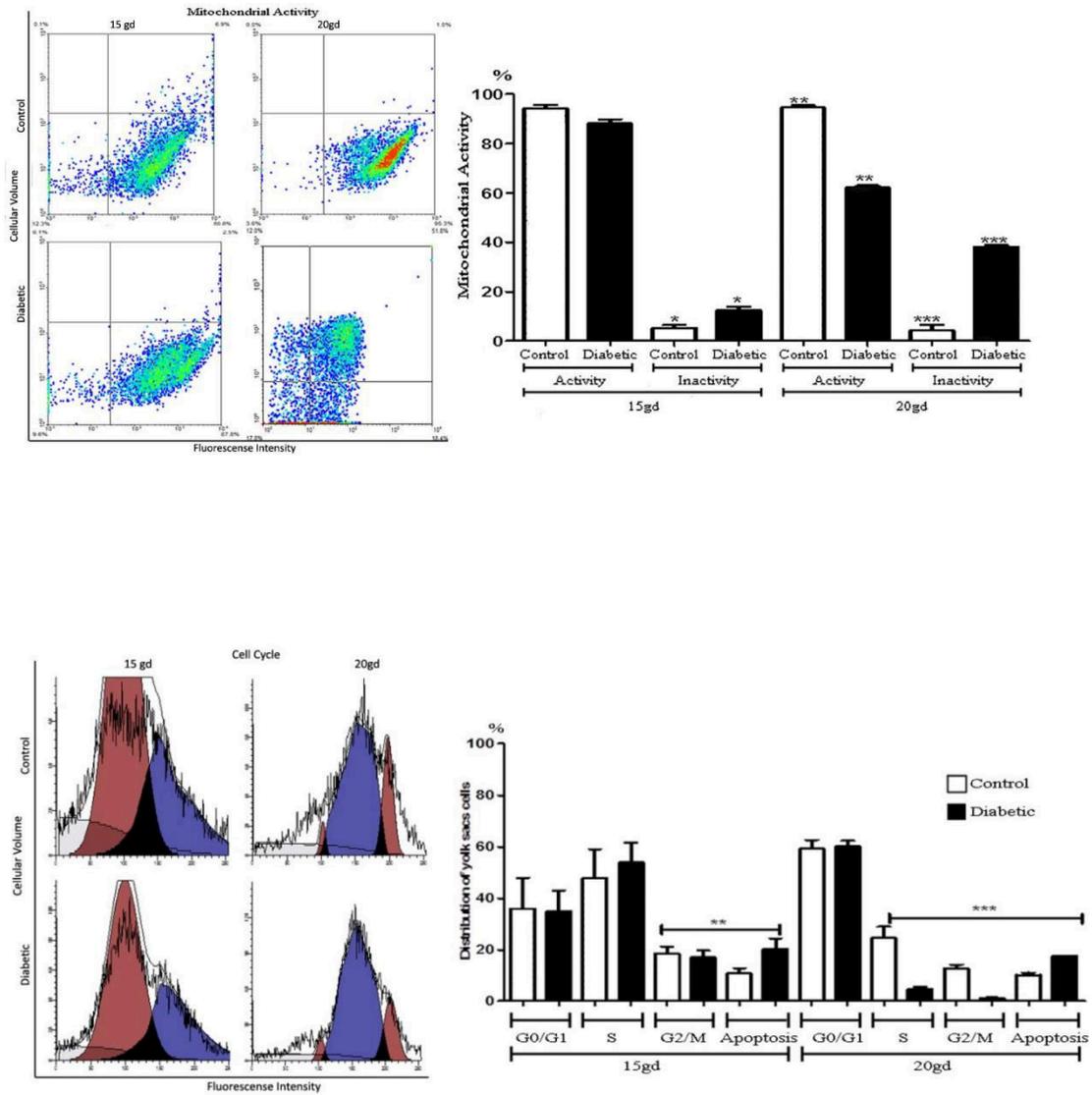
Markers expression was analyzed by following the same method as described above. We used the following markers: Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4, CD117, CD115, CD 44, CD34, VEGF-R1, COX-2, MCP-1, INF- $\gamma$  R1, L 1 and Caspase-3 phosphorylated. Adaptation in the method was performed in order to add specific primary antibody for each molecule and secondary antibody (Alexa-Fluor ® 488 - Invitrogen) labeled with FITC and incubated with night at 4°C. The expression of markers was determined by comparison with an isotope control unspecific fluorochrome-labeled FITC and data analyzed by WinMDI 2.9 software.

### **3. Statistical Analysis**

Statistical analyzes were performed in GraphPad software (Prism 5.0) test using one-way ANOVA and Tukey comparison considered significantly different values of  $p < 0.05$ .

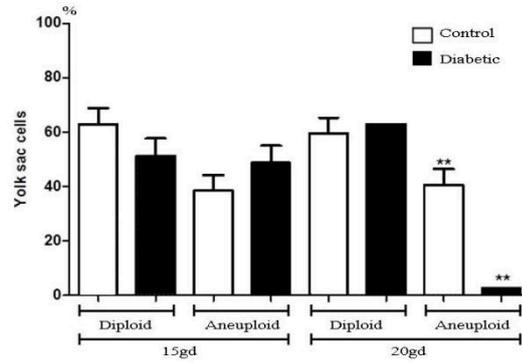
### **4. Result and Discussion**

The results of this study are organized according to the following criteria: Expression of mitochondrial activity in cells of the bag, Analysis of cell cycle phases of the yolk sac cells, analysis of the ratio and distribution of DNA / cell and cell Ploidy yolk sac , Expression of the markers of cellular receptors and yolk sac cells determined by flow cytometry.

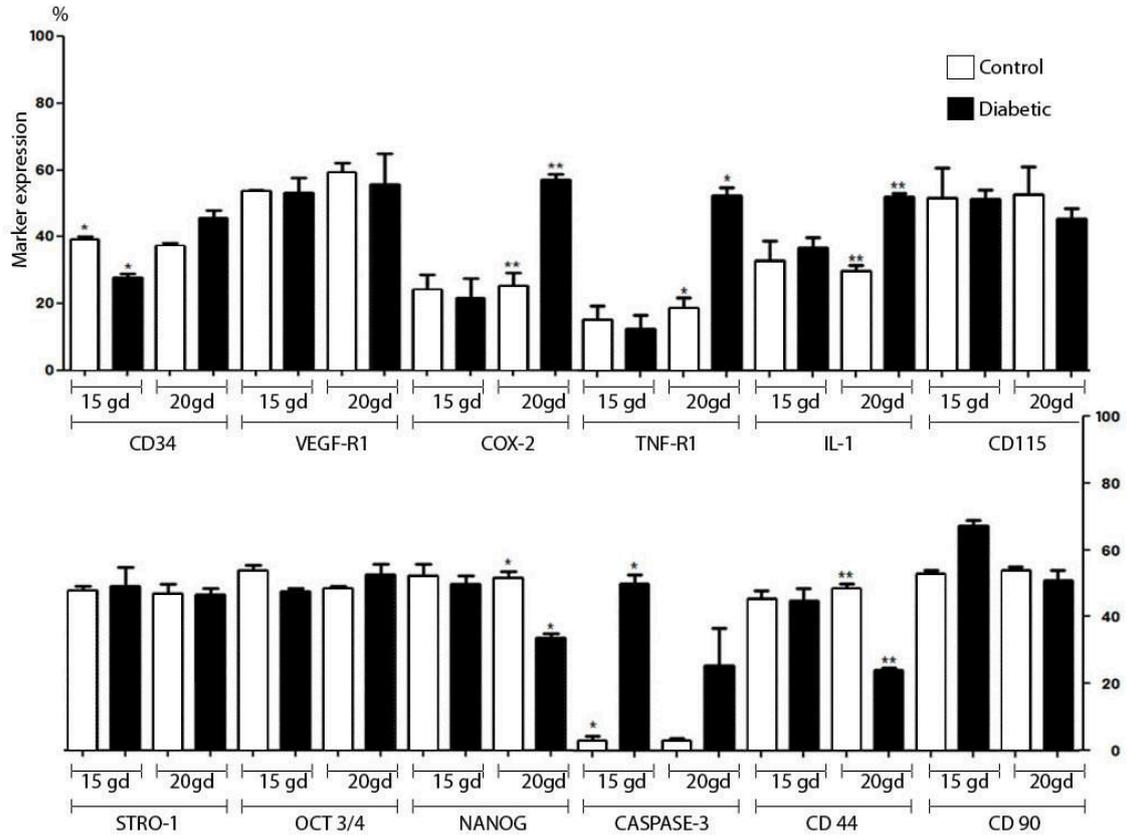


**Figure 01** Expression of mitochondrial activity in yolk sac cells of control and diabetic groups on 15gd and 20gd. Above dot plots demonstrating the percentage of cell populations expressing mitochondrial activity. Chart represents percentage values of activity and inactivity on cell population. Source: Santos J.R.A (2013).

**Figura 02** Expression of cell cycle activity and apoptosis in yolk sac cells of control and diabetic groups on 15gd and 20gd. At left the percentage of cell cycle phases of cell populations. Chart represents percentage values of cell cycle phases and apoptosis of cell populations. Source: Santos J.R.A (2013).



**Figure 03** Expression of cell ploidy of control and diabetic groups on 15gd and 20gd. Source: Santos J.R.A (2013).



**Figure 04** – Expression of markers on cell population of yolk sac of control and diabetic groups on 15gd and 20gd representing percentage values of activity and inactivity on cell population. Markers are associated to vase formation (CD34, VEGF-R1); inflammatory process (COX-2, TNF-R1, IL-1), pluripotency (CD 115, STRO-1, OCT 3/4, NANOG), cell death (CASPASE-3) and cell migration (CD 44, CD 90). Source: Santos J.R.A (2013).

## 5. Discussion and Conclusion

Mitochondrial activity analysis of cells of yolk sac in control and diabetic animals at 15th gd demonstrated high activity (92.84%) and (62.10%), respectively. Analysis at 20th gd regarding to mitochondrial inactivity demonstrated significant difference when comparing the control group (1.890%) in the diabetic group (38.04%) (Fig.1). Thus, we could infer that diabetes presented a negative influence on mitochondrial activity, demonstrated by the lowest level of mitochondrial activity and the elevated rate of inactivity in diabetic group. This scenario might be associated to permeability deregulation, mitochondrial integrity, cytochrome c release, apoptosis activation and proliferative capacity decreasing [2 ] and [ 25].

Caspase-3 played an important role-marker in the early stages of pregnancy as observed in the diabetic group at 15th gd (50.35%) compared to control group (3.050%) (Fig. 4) which might be related to a significant involution of the yolk sac, as a response to the metabolic interference caused by diabetes which might lead to changes of mitochondrial integrity and function being associated to cell death [26]. Not so far, apoptosis marker concentration might be associated to G2/M cell-cycle expression, which can demonstrate the yolk sac involutes accordingly to cell diminished activity and decreases its early-embryo importance at the third pregnancy trimester, what might be explained by the placenta performance [27]. The lowest rate of caspase marker expression in the diabetic group at 20<sup>th</sup> gd might be a response to the maximum involution of the yolk sac, however its involution is not complete as along the embryonic development, the yolk sac plays important role in the formation of posterior hindgut and progenitor cell [28].

During pregnancy, cell cycle control is involved in embryonic development and determines proliferative activity, apoptosis and cell death. Quiescence (G1) state was observed in all groups (G1), control group (29.67%-15gd; 62.17%-20gd), diabetic group (29.99%-15gd; 59.99%20gd). An increase of G2/M phase at 15 days in diabetic group was observed what might indicate proliferative capacity or cell cycle stopping (Fig. 2). At this point, cell can respond to proliferative stimulus or cell death; literature demonstrate an increase in cell proliferation near the end of pregnancy in response to fetuses increasing intake of micronutrients for its development [29] and [30]. We should claim diabetes might be harmful in the last period of pregnancy, because in diabetic group at 20th gd we observed an intensively decreasing in G2/M phase what might be explained by a cell cycle stopping associated to a reduction in the cell cycle progression or an apoptosis induction [31] and [32].

Diabetic group 20 gd demonstrates that diabetes in advanced gestational age decreases the potential of S phase in replicating DNA and parks the G2 / M phase leading to an arrest of proliferative capacity.

The expression demonstrated in diabetic groups with 15 and 20 gd indicates a decreased proliferative capacity in yolk sac cells, being supported by the results of the expression of CD 90, CD 44, NANOG markers; Based on this we might say that the advanced the gestational age, the lower the capability of cell proliferation in diabetic yolk sac.

It has been demonstrated that metabolic disorders can be understood by processes either of cytokinesis or senescence [16]. In our study, we demonstrate that in diabetic group 20 gd cell aneuploidy expression was significantly decreased (2.590%) (Fig.3), what could be related to the decrease in G2/M phase, both situations, suggest that the embryo at term in hyperglycemic conditions decreased proliferative capacity what might interfere on embryo formation [31] what support our results being suggestive that cell proliferation decreasing would be harmful in advanced gestational ages interfering in embryonic metabolism increasing the risk of pregnancy loss.

We observed a higher rate of apoptosis in diabetic animals at 15 gd (10.47%) and 20 dg (20.47%) compared to the control group 15 gd (9.005%) and 20 gd (10.98%), and more significantly expressed in the diabetic group 20 gd (Fig.2). Apoptosis processes is scored by standard morphological and biochemical cellular changes associated to normal program of cell death and also in various pathologies, stimulating a cellular response to changes in the microenvironment, [10], [12] and [41]. In our study, results analysis has lead us to suggest that diabetes induces changes in the microenviroment, inducing over expression of caspase and interfering in mitochondria activity [33 ] and [ 34].

Our hypothesis that diabetes might induce alterations on the microenvironment may also be supported by the analysis of cell markers. The expression of vessel formation marker (CD 34) demonstrated significant difference when compared to vessel receptor (VEGF-R1) (Fig. 4). It has been demonstrated a relation between the formation of vessels mediated by CD 34 and the formation of vascular system through the regulation of vessel growth and blood vessel survival mediated by VEGF-R1 [35] and [36]. VEGF-R1 is one of the most important regulators of angiogenesis element being produced by endothelium and acts in a paracrine mode [37].

VEGF-R1 expression was considered normally expressed in both groups and being related to the development of yolk sac vasculature. However, when we compare the diabetic group CD 34 expression to the number of receptors VEGF-R1 it is possible to suggest that diabetes is more damaging at the beginning of the late gestational period, as we can see an overexpression of receptors (VEGF-R1) and a decreased expression of vessel marker formation (CD34).

During pregnancy several pro-inflammatory factors are expressed to assist fetal delivery. When we analyzed the expression of these pro-inflammatory markers COX-2 TNF-R1, IL -1 in the yolk sac of control and diabetic pregnant rats perceive different changes in both groups. In control group 20 gd expression of COX-2 dg of 20 (25.25%), TNF-R1 20 gd (18.75%), IL-1 dg (30.05%) were decreased compared with 20 gd diabetic group that was significantly higher COX-2 (57.00%), TNF-R1 (52.50%), and IL-1 (52.35%) (Fig. 4), what might be explained by fetus delivery processes can be mediated by pro-inflammatory prostaglandins [38]. The increased expression of these markers at 20 gd enhances the involution process in the yolk sac at advanced gestational ages.

NANOG is a marker involved in pluripotency, in our study, diabetic group demonstrated an increase expression of NANOG markers at 15 dg (52.15%) and a decrease expression at 20 gd (34.00%). This condition has lead us to suggest that diabetes interferes on cell pluripotency, however, yolk cells demonstrated equilibrated expression of CD115 and OCT 3/4 (Fig. 4) also involved in pluripotency [39] and [15].

Stro-1 is considered the best marker for mesenchymal stem cells [40], but is not unique to this cell type, since the determination of cell type is dependent on a range of other transcription factors, as well as morphological differentiation.

Our findings suggest that diabetes played a potential interference on proliferation, migration, cell differentiation, induces to a mitochondrial inactivity, interfere on cell cycle and induct to apoptosis however, there is still no agreement in the literature about these

markers expression under diabetes condition. Foregoing view lead us to continue investigate diabetes, its metabolic disorders and its influence on pluripotency of cells along the gestational period in placenta and also the fetuses' pluripotent cells behavior. Furthermore, diabetes investigation need a multidisciplinary approach to determine its influence on pluripotent cells behavior and its application for cell therapy since diabetes incidence and prevalence remain high.

#### DISCLOSURE

All authors report no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mr. Francisco Albuquerque Klank for computer support.

#### References

1. L.C, Peres, C. N. Ribeiro, M. Gutierrez, M.C Foss. **Effect of alloxan-induced diabetes mellitus and ethanol on pregnancy outcome in mice.** J. Bras. Patol. Med. Lab, 45 (2009), p. 471-480
2. C. M Oliveira. **Diferenças nas expressões gênicas do saco vitelino de embriões bovinos provenientes de inseminação artificial e fiv.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, (2010), p.125
3. V. C. Wenceslau. **Análise de células mesenquimais do saco vitelino fígado e medula óssea de fetos caninos.** Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia. (2009) p. 36 -38
4. A. D. Mata et al. **Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human.** Mol Cell Biochem, 42 (2004), p. 137 – 261

5. T. M. Mayhew, D. S Charnock-Jones, P Kaufmann. **Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies.** *Placenta*, 25 (2004), p.127-39
6. G. Forsbach-sánchez, H.E Tamez-Peréz, , J Vazquez. **Diabetes and pregnancy.** *Arch. Med. Res*, 36 (2005), p.291-92
7. J.O Gjorret,P Maddox-hyttel. **Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures.** *Reprod. Fertil. Dev*, 17 (2002), p.234 -27
8. A. C. G Riveros. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos.** Dissertação de mestrado (ciências da saúde) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. (2009), p.42 -56
9. W.P. Jolie. **Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents.** *Teratology*, 41(1990), pp. 361–375
10. A. M Carter, L. BtansweL, V. K. M Thompson, K han, **Imunohistochemical identificantion of epithelial and mesenchymal cell types in the chorioallantoic and yolk sac placenta of the guinea-pig.** *Placenta*, 19 (1998), p. 489- 500
11. O. R. A. Conceição, C. E. Ambrósio, D. S. Martins, et al. **Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (Agouti paca) e cutia (Dasyprocta aguti).** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28 (2008), p. 253-259
12. M. A Miglino. et al., **O enigma vitelínico.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 6 (2009), p. 86
13. K. A Schaffer. **The cell cycle: A Review.** *Vet. Pathol.* 35, (1998) p. 461-478
14. V. L. A Pereira. **Importância do uso das células-tronco para a saúde publica.** *Rev. Ciênc. Saúde Coletiva*, 13 (1) (2008), p. 232

15. S.P. Lancrin C, C. Stephenson, T. Allen, V. Kouskoff. **Blood cell generation from the hemangioblast.** *Nature*, 12 (2009), p. 457
16. B.F King, P. Enders. **Comparative development of the mammalian yolk sac.** In: **Nogales, F.F. (editor). The human yolk sac and yolk sac tumors.** Berlin: Springer (1993) p.1- 23
17. H. Okada, T.W. Mak. **Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells.** *Nat Rev Cancer*, 4 (2004), p.592-603
18. T. W Sadler. **Langman Embriologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (2005). p.347
19. V. SiclarI, L. Qin. **Targeting the osteosarcoma cancer stem cell.** *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 5 (1) (2010), n. 1, p. 78
20. L. Fan. et al. **CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma,** *Published*, 29 (2011), p. 37
21. J. Pereda. **Significado morfofuncional del saco vitelino durante el periodo embrionario humano: revisión del problema e impacto en clínica** *Contribuciones Científicas y Tecnológicas. Área Ciências Médicas*, 128 (2001), p. 25-47
22. H.M Shapiro. **Membrane potential estimation by flow cytometry.** *Methods*, 21 (2000), p.271-279
23. C. Ulivieri. **Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria.** *Tissue and Cell*, 42 (6) (2010), p. 339-347
24. S. A Susin, H. K Lorenzo. et al. **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature*, 397 (6718) (1999), p. 441-446
25. P. Meier, A. Finch, G. Evan. **Apoptosis in development.** *Nature*, 407,(6805) (2000), p. 796-801

26. K. L. Moore, T. V. N. Persaud, K. Shiot. **Color atlas of clinical embryology. Chater 1 “ The first two weeks of human development”**. W. B. Saunders Company. **Philadelphia, London.** New York, St. Louiz, Sidney, Toronto, (2008), p.1-12
27. C. Hoffmann, B. Schuler. **The bovine placenta, a source and target of steroid hormones: Observations during the second half of gestation.** **Domestic Anim. Endocrinol**, 23 (2002), p. 309-320
28. MT. Facciotti, et al. **Large scale physiological readjustment during growth enables rapid, comprehensive and inexpensive systems analysis.** **BMC. Syst Biol**, 4 (2010), p. 64
29. P. O'farrell, B. Edgar, D. Lakich. **Directing cell division during development.** **Science**, 246 (4930) (1989), p. 635-640
30. J. Palis, M. C Yoder. **Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man.** **Experimental Hematology**, 29 (8) (2001) p. 927-936
31. D. Koshland. **The cell cycle.** **Science**, 246 (4930) (1989), p. 545
32. R. LASKEY, M. FAIRMAN, J. BLOW. **S phase of the cell cycle.** **Science**, 246 (4930) (1989) p. 609-614
33. G. Breier. **Functions of the VEGF/VEGF Receptor System in the Vascular System.** **Semin Thromb Hemost**, 26 (5) (2000) n, p. 553,560
34. G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch. **Endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.** **FASEB J**, 13 (1999), p. 9-22
35. L. Köhn A, et al., **Early Embryonic Vascular Patterning by Matrix-Mediated Paracrine Signalling: A mathematical model dtudy.** **PloS. Journal pone**. 6 (2011), p. 12-16

36. A Ashkenazi. **Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.** Nat Rev Cancer, 2 (6) (2002), p. 420-430
37. J.Y. Bertrand, D. Traver. **Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo** **Curr. Opin.** Hematol, 16 (2009), p.243-248
38. C. M. Kolf, E. Cho, R.S. Tuan. **Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.** Arthritis Res Ther, 9 (2000), p.204