

## BARREIRA PLACENTÁRIA DE *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

### PLACENTAL BARRIER OF *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

Jean Ezequiel LIMONGI<sup>1</sup>; Eloisa Amália Vieira FERRO<sup>2</sup>

**RESUMO:** O presente trabalho objetivou caracterizar ultra-estruturalmente a barreira placentária de *Calomys callosus*. *Calomys callosus* é um roedor de pequeno tamanho encontrado no cerrado brasileiro, principalmente na região do estado de Goiás. Utilizou-se amostras de placentas entre 15<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> dias de gestação. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 e processadas para inclusão em Epon e análise em microscopia eletrônica de transmissão. A placenta de *Calomys callosus* é composta pelas regiões de espongiotrofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto. No labirinto o sangue materno irriga células trofoblásticas ao passo que o sangue fetal está contido em vasos fetais presentes no mesênquima das trabéculas trofoblásticas. Separando o sangue materno do sangue fetal encontram-se 3 camadas de células trofoblásticas (camadas I, II e III), sendo esta placenta considerada hemotricorial, além do endotélio fetal. Estas camadas constituem a barreira placentária e, a medida que progride a gestação, tornam-se progressivamente mais delgadas.

**UNITERMOS:** Barreira placentária, *Calomys callosus*, Trofoblasto, Placenta.

### INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão transitório, formado pela interação de tecidos fetais e maternos, e apresenta como funções gerais: intercâmbio de nutrientes e gases, e também atua como um órgão endócrino responsável pela produção de hormônios que garantem a continuidade da prenhez (SOARES *et al.*, 1996). Em roedores, a placenta é constituída pela porção materna, a decídua, além de apresentar 2 regiões distintas em sua porção fetal: a zona juncional e a zona do labirinto. A zona juncional está localizada próxima à decídua materna e ambas as regiões possuem funções endócrinas (GIBORI, 1994; SOARES *et al.*, 1996), sendo irrigadas apenas pelo sangue materno. A zona do labirinto recebe tanto sangue materno quanto sangue fetal, constituindo a principal região de trocas metabólicas da placenta (FERRO, 1991). Em roedores, a barreira placentária é constituída por camadas trofoblásticas mais o endotélio fetal.

As camadas trofoblásticas de roedores se organizam em três camadas, sendo a placenta classificada como hemotricorial (ENDERS, 1965). Em ratos e camundongos estas camadas se organizam da seguinte

maneira: 1) Camada I, onde células individualizadas estão em contato com o sangue materno. Parte destas células são gigantes e apresentam funções endócrinas (SOARES *et al.*, 1996) além da ocorrência de fenestrações na camada (TAKATA *et al.*, 1997); 2) Camada II ou intermediária, onde células sinciciais apresentam função essencialmente endocítica, contendo vesículas cobertas por clatrina (TAKATA *et al.*, 1997); 3) Camada III, também sincicial e apresenta uma importante função seletiva por servir como barreira às macromoléculas (ENDERS *et al.*, 1998). Junções comunicantes estão presentes entre as camadas trofoblásticas II e III (TAKATA *et al.*, 1997).

A superfamília Muroidea abriga grande número de espécies de roedores que habitam todo o mundo. Incluídos nestas, estão as famílias Cricetidae, à qual pertencem os hamsters e o *Calomys callosus*, e Muridae, que incluem os ratos e camundongos (FERRO, 1991).

*Calomys callosus* é um roedor de pequeno tamanho, encontrado no cerrado brasileiro, principalmente no estado de Goiás (MELLO, 1981). Estes animais apresentam longevidade e reprodutividade satisfatórias para o uso experimental (MELLO, 1981), além de

<sup>1</sup> Biólogo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>2</sup> Professora Adjunta da área de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia

Received: 20/02/03

Accept: 05/05/03

constituir um excelente modelo biológico para o estudo de várias doenças, tais como a toxoplasmose (FERRO et al., 1999), doença de Chagas (RIBEIRO, 1973) e leishmaniose (MELLO, 1977) dentre outras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Espécimes:

*Calomys callosus* foram criados no biotério do laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Uberlândia e utilizados ao atingirem a idade de três meses. Os animais foram mantidos no biotério com dieta *ad libitum* de água e ração granulada complementada com semente de girassol, aveia e milho e sob ritmo de iluminação (claro-escuro) de 12 horas.

### Acasalamento:

O acasalamento foi feito em gaiolas contendo 2 fêmeas para cada macho. A constatação do acasalamento deu-se através do “plug” vaginal. A presença do “plug” vaginal caracteriza o primeiro dia de gestação.

### Coleta de material:

Os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico. Após laparotomia, os cornos uterinos foram retirados e mantidos em placa de Petri contendo solução fixadora, onde foram dissecadas as placentas e recortadas em fatias, para a rotina de microscopia eletrônica desde o 15<sup>o</sup> até o 20<sup>o</sup> dia de gestação.

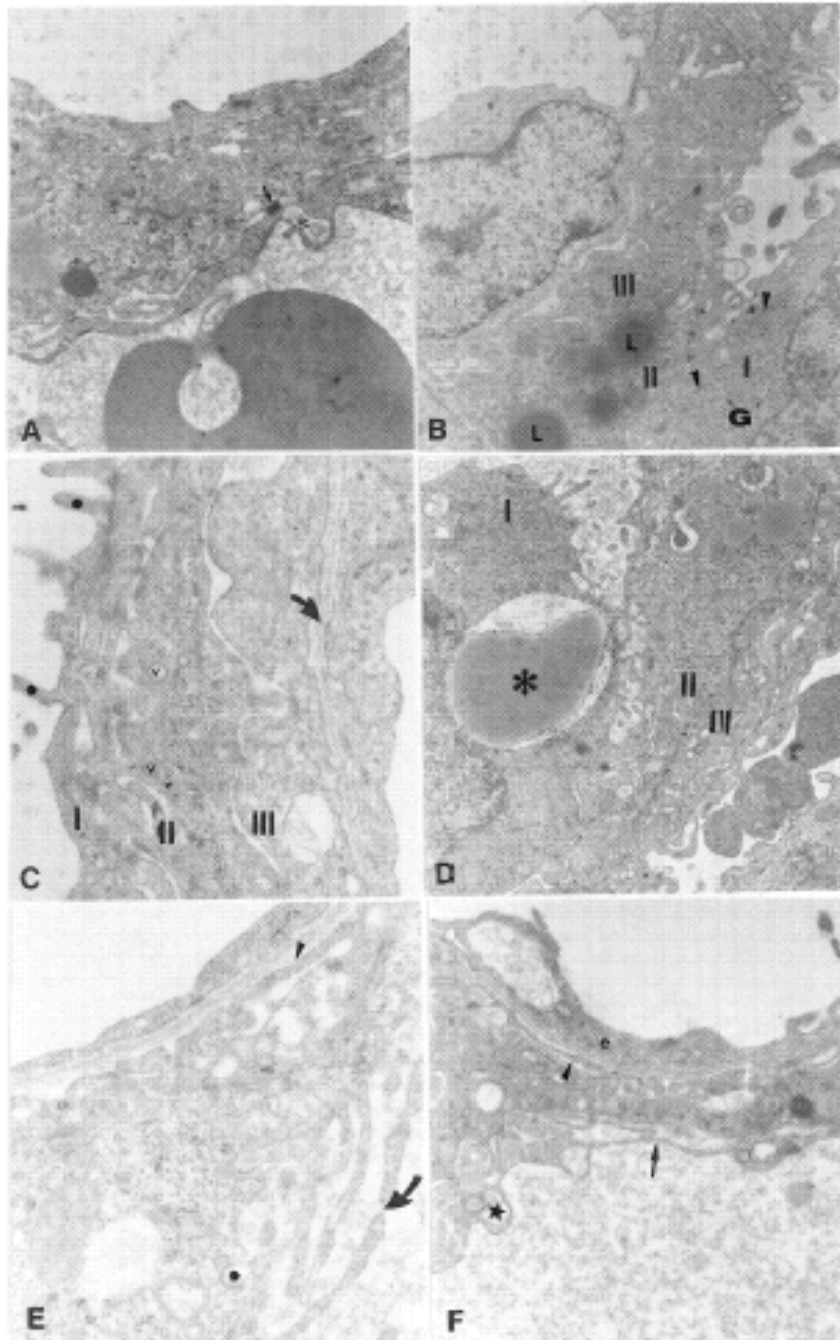
### Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão:

Os cortes de placenta foram mantidos em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5%, 0,05 M de sacarose em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 24 hs. Uma vez fixados, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e pós-fixados em tetróxido

de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M, durante 1 hora. Após lavagens sucessivas em tampão fosfato, os fragmentos foram submetidos a uma bateria de desidratação em etanóis, de concentrações crescentes (50-100%), sendo então infiltrados por óxido-propileno. Posteriormente, os fragmentos permaneceram durante doze horas, numa mistura de partes iguais de óxido-propileno e resina Epon, após o que, foram mantidos por 1 hora em resina pura a 60 °C. A seguir foram incluídos em uma nova resina pura e orientados de modo a obter-se cortes transversais da placenta. Para polimerização da resina, os blocos permaneceram em estufa a 60 °C durante 72 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em um ultra-micrótomo REICHERT-JUNG. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, em água destilada, durante 30 minutos e pelo citrato de chumbo 0,5%, em água destilada, durante 40 minutos. As observações ultra-estruturais e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio eletrônico ZEISS 109 (Carl Zeiss, Alemanha).

## RESULTADOS

A barreira placentária de *Calomys callosus* mostra-se constituída por três camadas trofoblásticas mais o endotélio fetal (Figura 1A). A camada trofoblástica que está em contato com o sangue materno é a camada trofoblástica I. De maneira geral, esta é a mais fina das camadas. Caracteriza-se por projeções filiformes, mergulhadas em sangue materno, e pelo contato descontínuo com a camada subjacente, com a qual estabelece junções íntimas através de desmossomos (Figura 1A). Na superfície dessa camada, vesículas de pinocitose e numerosas fenestrações são frequentemente observadas (Figura 1A).



**Figura 1. A.** Observar desmossomos (→) entre as camadas de células trofoblásticas. Observar também vesículas de macropinocitose (\*) na camada I. **B.** Observar célula gigante (G) da camada I com núcleo eucromático e Retículo endoplasmático rugoso desenvolvido (▴). Na camada II notar as inclusões lipídicas (L) **C.** Nesta eletromicrografia pode-se observar as três camadas trofoblásticas mais o endotélio fetal. Observar na camada I numerosas projeções citoplasmáticas (\*). Notar também a presença de vesículas de endocitose na camada II (v). A lâmina basal da camada III aparece fundida à lâmina basal endotelial (→). **D:** Observar célula da camada I internalizando um elemento sanguíneo materno (\*). **E:** Observar fenestrações na camada I (→) e vesículas de endocitose na camada II (\*), além de projeções citoplasmáticas na camada III (▴). **F:** Nesta eletromicrografia observa-se a barreira placentária delgada. A superfície da camada I é marcada por vesículas de macropinocitose (\*) e fenestrações (→). Na camada III é possível observar projeções citoplasmáticas (▴). (e), endotélio fetal. Eletromicrografias: A: 56000 x; B: 31200 x; C: 103000 x; D: 31200 X; E: 56000 X; F: 31200 X.

A camada intermediária, ou camada II, é a mais espessa das três camadas. Inclusões lipídicas e polissomos (Figura 1B) são abundantes nesta camada, bem como vesículas de endocitose. Ao contrário da superfície de contato com a camada I, a que se relaciona com a camada III, é bem mais regular (Figura 1C).

A camada trofoblástica III é espessa e mantém grande proximidade com a camada II (Figura 1D). Projeções bulbosas na interface com a camada II e também próximas à lâmina basal são observadas (Figura 1D). Vesículas de endocitose não são observadas nesta camada. A lâmina basal trofoblástica adere intimamente à lâmina basal do endotélio fetal (Figura 1E).

A espessura da barreira placentária, observada em uma mesma amostra, é variável de acordo com a região analisada. A camada trofoblástica II é a que mais varia, sendo consideravelmente delgada nas regiões onde não são observadas inclusões lipídicas.

Do 15<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dias de gestação, a barreira placentária diminui gradualmente em espessura, sendo sensivelmente menor ao final da gestação (Figura 1F).

## DISCUSSÃO

A barreira placentária de *Calomys callosus* organiza-se em três camadas trofoblásticas, que envolvem capilares fetais. Esta disposição trofoblástica também é observada em outros roedores (ENDERS, 1965; TAKATA et al., 1997), e pode ser classificada como hemotricorial (ENDERS, 1965). As três camadas trofoblásticas, semelhante ao observado em ratos e camundongos (TAKATA et al., 1997), são classificadas como camadas I, II e III, partindo do contato com o sangue materno em direção ao capilar fetal.

A natureza absorptiva da camada trofoblástica I pode ser inferida através das características morfológicas apresentadas por esta população celular. Projeções citoplasmáticas filiformes são banhadas por sangue materno. Além disso, vesículas de pinocitose são observadas com relativa frequência na superfície livre desta camada celular.

Nossos resultados mostram também a presença de numerosas fenestrações na camada I, reforçando a sua frágil função como barreira. Assim, provavelmente, esta camada seja absorptiva. Esta característica também é descrita por Takata et al. (1997), na placenta de ratos e camundongos. A formação de fenestrações no citoplasma da camada I permite o livre acesso dos constituintes do sangue materno ao espaço entre as camadas I e II (TAKATA et al., 1997). Conseqüentemente, a camada I, provavelmente, não representaria uma barreira na permeabilidade placentária.

Na camada I observa-se algumas vezes células grandes, com núcleos eucromatínicos. Flagrantes de fagocitoses de elementos sanguíneos maternos feitos por estas células são observados. Takata et al. (1997) descrevem células semelhantes na placenta de hamsters e as classificam como células gigantes labirínticas. Entretanto não faz referência à presença de atividade fagocitária nestas células. Segundo Ferro (2000) esta população celular apresenta declínio tardio de atividade fagocitária.

A camada trofoblástica intermediária, ou camada II, é a mais espessa das três camadas observadas. Segundo Metz et al. (1978), a camada trofoblástica II serve como barreira primária no conjunto da barreira placentária. Quando marcadores celulares são administrados via compartimento materno da placenta de ratos, estes rapidamente penetram na camada trofoblástica I e se difundem para o espaço entre as camadas I e II, mas não passam pela camada II. A camada I possui fenestrações que a torna permeável aos marcadores, mas a camada II bloqueia efetivamente estas substâncias (TAKATA et al., 1997).

Outra característica marcante da camada II é a presença de vesículas de pinocitose na sua face materna, sendo característica de células que realizam intenso transporte molecular, provavelmente mediado por receptores.

Presença de inclusões lipídicas no citoplasma da camada II, representa, provavelmente, reserva energética na barreira placentária de *Calomys callosus*. Em ratos, estas reservas são também observadas (TAKATA et al., 1997), no entanto, não são tão abundantes quanto aqui é demonstrado.

A camada trofoblástica III é espessa. Na interface com a camada II observa-se grande proximidade de suas membranas, sugerindo a presença de junções comunicantes entre estas camadas, embora não tenhamos observado tais junções. Estudos de criofratura na placenta de ratos (METZ et al., 1976a), demonstram a presença dessas junções comunicantes entre as camadas II e III.

Segundo Metz et al. (1976a), junções comunicantes também são observadas em placentas hemocoriais de outras espécies, quando múltiplas camadas trofoblásticas são formadas, a exemplo da placenta hemodiorial de coelho e na placenta hemotricorial de roedores (METZ et al., 1976b).

De maneira semelhante ao observado em ratos (TAKATA et al., 1997), raramente se observam vesículas de endocitose na camada III, sugerindo baixa atividade endocítica nesta camada. Provavelmente o transporte molecular nesta camada seja realizado principalmente por



junções comunicantes do tipo “gap”. Em ratos, o transporte de glicose entre as camadas II e III provavelmente é realizado por junções comunicantes, sendo mediado principalmente pela conexina 26 (TAKATA et al., 1997).

Outra característica importante da barreira placentária de *Calomys callosus* é a variação de espessura, durante o período gestacional. Segundo Ferro (2000), na placenta a termo de *Calomys callosus*, a espessura das camadas trofoblásticas é sensivelmente menor do que na placenta de 15 dias. Nossos resultados, durante o período gestacional estudado, confirmam esta descrição. No entanto, vale ressaltar que, em uma mesma amostra, a espessura das camadas trofoblásticas pode variar sensivelmente de acordo com a região analisada. Porém, apesar de a espessura das camadas não ser uniforme num dado momento da gestação, a diminuição da espessura da barreira placentária durante a gestação

pode ser confirmada quando da análise de diferentes amostras, em diferentes períodos gestacionais.

## CONCLUSÕES

- As células trofoblásticas da barreira placentária de *Calomys callosus* organizam-se em três camadas, sendo a placenta, portanto, classificada como hemotricorial.
- A camada trofoblástica I apresenta numerosas fenestrações.
- A camada trofoblástica II apresenta características ultra-estruturais típicas de células que realizam intenso transporte molecular.
- A espessura da barreira placentária é variável numa mesma amostra.
- A espessura da barreira placentária na placenta a termo (20 dias) é menor do que aos 15 dias de gestação.

---

**ABSTRACT:** The objective of this work was to characterize the ultrastructure of the placental barrier of *Calomys callosus* between the 15th and 20th days of gestation. *Calomys callosus* is a small rodent found in the central region of Brazil, mainly distributed in the State of Goiás. For this study samples of placenta between 15th and 20th days of gestation were used. The samples were fixed in glutaraldehyde 2.5% and embedded in Epon and were studied in a Zeiss 109 transmission electron microscope. During the period of analysis it was observed that the maternal blood surrounds the trophoblast cells, while the fetal blood is contained in fetal veins, formed in the mesenchyme of the trophoblast trabecula. Separating the maternal blood from the fetal blood there are 3 layers of trophoblast cells (layers I, II and III) and fetal endothelium. These layers formed the placental barrier and during the gestation progress they became thinner.

**UNITERMS:** Placental barrier; *Calomys callosus*; Trophoblast cells; Placenta.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v. 116, n. 1, p. 29-68, 1965.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K.C.; ENDERS, S. Morphological variation in the areas of chorioallantoic placenta. **Trophoblast. Res.**, London, v. 12, n. 1, p. 1-19, 1998.

FERRO, E. A. V. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. 1991. 130 f. Dissertação (Mestrado em Histologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

\_\_\_\_\_. **Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus***. 2000. 147 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) trophoblast cells as host to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitol. Res.**, Belfast, v. 85, n. 8-9, p. 647-654, 1999.

GIBORI, G. The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A. (Ed.). **Endocrinology of embryo-endometrium interactions**. New York: Plenum, 1994. p. 217-222.

MELLO, D. A. Note on breeding of *Calomys expulsus*, Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae) under laboratory conditions. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 107, 1977.

\_\_\_\_\_. Studies on reproduction and longevity of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) under laboratory conditions. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 841-843, 1981.

METZ, J.; HEIRINCH, D.; FORSSMANN, W. G. Ultrastructure of the labyrinth in the rat full-term placenta. **Anat. Embryol.**, Berlin, v. 149, n. 2, p. 123-148, 1976a.

\_\_\_\_\_. Gap junctions in hemodichorial and hemotrichorial placenta. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 171, n. 3, p. 305-315, 1976b.

METZ, J.; AOKI, A.; FORSSMANN, W. G. Studies on the ultrastructure and permeability of the hemotrichorial placenta. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 192, n. 3, p. 391-407, 1978.

RIBEIRO, R. D. Novo reservatório do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 429-437, 1973.

SOARES, M. J.; CHAPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C.A.; KAMEI, T. Differentiation of trophoblast endocrine cells. **Placenta**, London, v. 15, n. 5-6, p. 287-289, 1996.

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **J. Rep. Development**, Tokyo, v. 43, n. 1, p. 1-17, 1997.