DAVID MONTES ITURRIZAGA

DEDALUS - Acesso - FMVZ

1120027916

Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico
da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)

**Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico
da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)**

T.1599
FMVZ

FMVZ - 024128

São Paulo
2005

DAVID MONTES ITURRIZAGA

**Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico
da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)**

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

Departamento:

Clínica Cirúrgica

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1599 FMVZ	<p>Montes Iturrizaga, David</p> <p>Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta de lhama (<i>Lama guanicoe glama</i>) / David Montes Iturrizaga. – São Paulo: D. Montes Iturrizaga, 2005. 147 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.</p> <p>1. Placenta. 2. Lhama. 3. Trofoblasto. 4. Uteroferrina.</p> <p>I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

P A R E C E R

Interessado: David Montes Iturrizaga

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 777/2005, intitulado: "Estudo microestrutural, histoquímico e imunohistoquímico da placenta de lhamas (*Lama guanicoe glama*)", no qual foram utilizados 09 (nove) placentas de lhamas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 17 de novembro de 2005.

Profa. Dra. Julia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTES ITURRIZAGA, David

Título: Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2005

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

“Hasta la Victoria Siempre”

(“Che” Guevara)

Como sempre ao meu pai Roberto, pelo exemplo de superação acadêmica e por estar sempre presente na minha mente e no meu coração.

A minha mãe Adriana por ser exemplo de luta e esforço constante para tornar realidade as esperanças e os planos de vida.

Aos meus irmãos Roberto, Iván, Adriana, Milagros e Pamela, por ser excelentes pessoas e me brindarem sempre todo seu apoio e força.

A Ela, pela paciência, ajuda, e sobre tudo pelo seu grande amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero agradecimento a Dra. Maria Angélica Miglino, orientadora do presente trabalho, pela sua confiança e oportunidade outorgada ao me aceitar como aluno de mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo do Programa Estudante Convênio– Pós-Graduação (PEC-PG). Muito obrigado por esta grande oportunidade.

Ao Instituto de *Investigaciones Tropicales y de Altura* sede Maranganí (Cusco) da *Universidad Nacional Mayor de San Marcos* (Cusco) e à *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Altiplano (UNA)* (Puno) por ter cedido gentilmente os animais para a presente pesquisa.

À Profa. Dra. Flávia Thomaz Verechia, do laboratório de Histologia da UNESP-Dracena, pela ajuda, grande paciência e amizade demonstradas para a realização das análises histoquímicas, assim como às alunas Kelen Burioli e Silmara Silva e a todo o pessoal técnico pela boa disposição.

À Sra. Marília Thomaz Verechia e o Sr. Nélio Verechia, por toda a sua amabilidade, atenções e sincera hospitalidade. Sempre ficarei muito agradecido com vocês.

A Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos, por todas as dicas de laboratório que ajudaram a realizar a presente pesquisa e a sua ajuda com as eletromicrografias de transmissão, quanto sua ajuda na correção do texto.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, e aos colegas de pós-graduação Tais Sasahara, Vivian Samoto e Emerson Fioretto, pela paciência e ajuda no uso do microscópio para a obtenção de fotomicrografias.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior por ter disponibilizado o uso do laboratório de imunologia, a Janaína Monteiro e Flávia Pereira pela sua ajuda nos procedimentos para a detecção da uteroferina.

Ao Prof. Pedro Primo Bombonato pela gentileza de ajudar a corrigir o texto e por todas as atenções prestadas.

Ao pessoal técnico de ICB-USP, Sr. Gerson, Sr. Gaspar e Sr. Edson pela ajuda com o material de microscopia eletrônica, captação de imagens e eletromicrografias, meu sincero agradecimento.

A Thaisa Roat pela sua amizade sincera e desinteressada e toda a ajuda e dicas no processamento do material de laboratório.

Ao pessoal técnico e administrativo do Departamento de Anatomia Animal da FMVZ-USP, por todas as facilidades, atenções e boa disposição e às secretárias de pós-graduação, Sandra Doménica, Claudia Lima e Dayse Flexa.

Ao pessoal de informática da FMVZ-USP, Luana, Rubens, Miro e António, pela amabilidade e gentileza no serviço de impressão.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias, pela sincera amizade oferecida e toda a força e ajuda oferecida durante este tempo.

Aos amigos e patrícios Jesús Mena, Christian Paz, Cristian Valle e Karina, pelo imenso apoio e todas as dicas.

Ao meu amigo e parceiro de república Jorge Chacón, pela nova amizade, confiança e companheirismo demonstrados durante todo o tempo de nossa estada no Brasil.

A Eliane Mingues, pela ajuda desinteressada e por as observações finais.

Ao meu amigo e novo irmão brasileiro, Isaac Albuquerque, pela sua grande amizade e companheirismo, porque para ser irmãos não é preciso ter o mesmo sangue. Muito obrigado por tudo amigo.

As minhas vizinhas e amigas de pós-graduação, Cristiane Takamine,

Procassia Lacerda e Vivian Moraes, por ser tão amáveis e me fazer sentir sempre em boa companhia. A Fernando Garbelotti, Ricardo Guerra, Adilson Manguetti, Marco Gomes de Oliveira, Felipe Braga, Antônio Neto, Thiago Aloia e Diogo Palermo pela amizade, companheirismo e bom senso de humor. A Gisele Saviani, Tatiana Bragante, Káterin Grondona, Camila Trevisanni, Haley de Carvalho, Roselaine Ponso, Edson Benetti, Alexandre Schmaedecke, Vanessa Marques, Robson Giglio, Lílian Olivera e Josy Cal, pela amizade sincera oferecida em todo momento.

À turma 70 de graduação da FMVZ-USP, pela amizade, simpatia e por serem excelentes alunos.

RESUMO

MONTES ITURRIZAGA, D. **Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)**. [Microestructural, histochemistry and immunohistochemistry study of the llama's placenta (*Lama guanicoe glama*)]. 2005. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

A placenta de lhama tem sido descrita como epitélio-corial, mas os estudos existentes não aprofundam nos aspectos microscópicos. Para detalhar as características microestruturais foram feitas observações ao microscópio de luz, eletrônico de varredura e de transmissão. Foram coletados 09 úteros grávidos em associação com as membranas fetais, entre 28 a 36 semanas de gestação. Parte do material foi fixado com solução de paraformaldeído 4% e emblocado em paraplast e historesina. Seções de 5µm foram submetidas a colorações de hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson, reações histoquímicas de PAS, Perl's e fosfatase ácida, e imunohistoquímica para a detecção de uteroferrina. Fragmentos foram fixados com glutaraldeído 2,5%, para microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados observados permitem classificar a placenta da lhama como corioalantóidea, difusa, pregueada, epitéliocorial e o feto esta recoberto pela membrana epidermal. O trofoblasto apresentou células de morfologia variada, desde cúbicas, arredondas até triangulares, com citoplasma contendo grânulos PAS+. Células binucleadas com citoplasma aumentado e núcleos arredondados, bem como células trofoblásticas gigantes com múltiplos núcleos, também foram observadas. As aréolas estavam preenchidas de material PAS positivo. Observaram-se grande quantidade de vasos sangüíneos na interface materno-fetal, entre as células do epitélio uterino e ao redor das projeções coriônicas, as quais eram ramificadas. O mesênquima com fibras colágenas em grande quantidade auxiliam no suporte das

projeções coriônicas. Observou-se positividade as reações histoquímicas de PAS, Perl's e fosfatase ácida, e imunohistoquímica de uteroferrina na interface materno fetal, mas com maior notoriedade no epitélio e lume das glândulas uterinas. Células trofoblásticas gigantes com 4 ou mais núcleos estavam nas projeções coriônicas, mostrando escassa ou nula reatividade histoquímica ao PAS, indicando funcionalidades diferentes das células trofoblásticas mono ou binucleadas. O alantóide estava conformado por uma camada única de células de diferentes alturas, sendo que na superfície destas observaram-se estruturas circulares e poliédricas. A membrana epidermal possui um epitélio estratificado plano de até sete camadas de células mono, bi ou trinucleadas. A alta vascularização das faces materna e fetal, a qual indica uma ótima troca de substâncias entre ambas faces, e a alta atividade metabólica demonstrada nas glândulas uterinas revelam uma adaptação da gestação desta espécie habitante das altas altitudes da serra do Peru.

Palavras-chave: Placenta. Lhama Trofoblasto. Uteroferrina.

ABSTRACT

MONTES ITURRIZAGA, D. **Microestructural, histochemistry, and immunohistochemistry study of the llama's placenta (*Lama guanicoe glama*).** [Estudo micro-estrutural, histoquímico e imunoistoquímico da placenta de lhama (*Lama guanicoe glama*)]. 2005. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

The placenta of the llama has been described like epitheliochorial, but existent researches don't study in depth microscopic aspects. In order to detail their ultrastructurals characteristics observations were made by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Samples of nine uteruses between 28 to 36 weeks of pregnancy were collected in association with fetal membranes. A part was fixed with of 4% paraformaldehyde solution and embedded either in paraffin or in glycol methacrylate resin. Sections of 5µm in thickness were stained with haematoxylin and eosin, Masson's trichrome staining and PAS (Perl's and acid fosfatase, and immunohistochemistry for utero ferrina detection. Another part was fixed with 2,5 % glutaraldehyde and post-fixed in 1% osmium tetroxide and processed for SEM. The trophoblast presented cells of morphology varied, since cubical, rounds off until triangular, with cytoplasm with granules PAS+. Binucleates cells with increased cytoplasm and spherical nucleus, as well as giant trophoblastics cells with multiple nucleus, had been also observed. Aréolas was filled of positive material PAS. Great amount of blood vessels are in the maternofetal interface, between the cells of uterine epithelium and around of the chorionic projections. Collagen fibers are observed in the mesenchymae and inside the chorionic projections. PAS positive reaction was observed in the materno-fetal interface, mane manifest in epithelium and lumen of uterine glands. Giant size trofoblastic cels of 4-7 or more nucleus were found in chorionich proyections, showing scarce or nule histochemistry reactivity, indicating different functionalities of

different kind of mono or bi nucleated cells. The allantois is structured by an unique layer of different sizes cells, in their surface are circular and polyhedral structures, representing a morphological consideration from this type of function allantois cells. The epidermal membrane is formed by 7 or more layers of cells with one, two or three nucleus. The superficial layer present more smooth cells. The high vascularization of the maternal and fetal faces indicates an optimal interchange of substances between both. The collagen inside the chorionics projections serves as a support skeleton), and the high metabolic demonstrate activity in uterine glands, develop a pregnancy adaptation of these specie who lives in highs of Perú .

Key words: Placenta. Llama. Trophoblast. Uteroferrina.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - a) Mapa do Perú mostrando sua divisão política em Departamentos, b) Mapa do Departamento de Cusco, destacando a Província de Canchis, c) Mapa do Departamento de Puno, mostrando a Província de Melgar. Em ambas as Províncias foram coletadas amostras utilizadas nesta dissertação..... 75
- Figura 2 - Rebanhos de lhamas (*Lhama guanicoe glama*). Notar a variedade de cores do pêlo e a formação de grupos. As orelhas em formato de “banana” e comprimento da face, são algumas das características que as diferenciam de outros camelídeos sul-americanos 76
- Figura 3 - a) Útero grávido de 261 dias. Notar a presença do feto localizado no corno uterino esquerdo e a saliência das suas extremidades desenvolvidas. A superfície externa do útero apresenta abundantes vasos sanguíneos dando-lhe aspecto avermelhado; b) Esquema do feto mostrando a sua localização, e sua relação com as membranas placentárias no estágio final de prenhez.; c) Feto de 261 dias. Neste estágio é notória a presença de pêlo cobrindo toda a superfície corporal. Os coxins acham-se em desenvolvimento (régua = 20cm); d) Cortes transversais das membranas placentárias ; sitio de deiscência do amniocório (D); cérvix (E); corpo do útero (F); corno uterino não grávido (G); cavidade amniótica (H); cavidade alantoica (I); amniocório (J); alantocório (K); amnioalantóide (L); feto coberto pela membrana epidermal (M). (Tomado de Fowler; Bravo, 1988) 80
- Figura 4 - Fotomicrografias da área do endométrio próximo às projeções coriônicas (pc). Observar glândulas uterinas em abundante quantidade (g) e vasos sanguíneos maternos (vm) desenvolvidos e preenchidos de eritrócitos (e). Histoiresina, HE, a) 50x, b) 200x (barra = 40µm). c) Vaso sanguíneo materno mostrando a camada muscular (cm) e endotélio espesso (en). Paraplast, HE, 400x (barra = 20µm). 84
- Figura 5 - Eletromicrografia de varredura. Corte transversal, a) projeções coriônicas (pc) em contato com o endométrio uterino (seta), (F = face fetal, M = face materna), 48,57x (barra = 100µm), b) interface materno-fetal, observar o desenvolvimento das glândulas uterinas, preenchidas por secreção. Projeções coriônicas em contacto com o endométrio. 22,85x (barra = 200µm), c) Notar a proximidade entre as projeções coriônicas e o reduzido espaço existente entre elas. 91,42x (barra = 100µm, d) Detalhe de projeção coriônica denotando no eixo central a presença de maior concentração de fibras colágenas (seta). 108,57x (barra = 100µm) 85

- Figura 6- Fotomicrografias do trofoblasto e interface materno-fetal. Observar as células do trofoblasto (T) contendo núcleos grandes. Observar ainda o mesênquima (m) com vasos sanguíneos fetais (vf) muito próximos uns de outros. Mesênquima com abundantes fibroblastos (f). Notar a proximidade entre a face materna (M) e o trofoblasto. Vasos sanguíneos localizados junto ao epitélio uterino, e outros interpostos entre as faces materna e fetal. Tais vasos podem ainda estar localizados nos espaços que separam as projeções coriônicas (pc). Vaso sanguíneo materno (vm). Resina Spurr, Azul de Toluidina, a) 400x. Paraplast, HE, b) 400x (barra = 20µm), c) 1000x (barra = 10µm), d) 1000x (barra=10µm)... 86
- Figura 7- Fotomicrografia. Células trofoblásticas. Observar em a) célula trofoblástica binucleada (cb), outra de maior tamanho (CB) se acha deslocada no mesênquima (m), b) Célula trofoblástica gigante (cg), citoplasma com basofilia marcada e vários núcleos, c) duas células trofoblásticas gigantes juntas mostrando no citoplasma uma basofilia notória e grande quantidade de núcleos. Reatividade PAS + nas membranas basal e laterais. É possível notar a presença de restos de membranas laterais (seta) entre ambas as células. Paraplast, a) HE 1.000x (barra = 10µm), b) PAS 40x (barra = 20 µm), c) PAS 40x (barra = 20µm) 87
- Figura 8 - Fotomicrografias. Corte transversal. Observar as ramificações digitiformes das projeções coriônicas (setas). Notar ainda a grande quantidade de vasos sanguíneos fetais (vf) de grande diâmetro, preenchidos por eritrócitos localizados por todo o contorno do mesênquima (m). No mesênquima encontram-se ainda fibroblastos (f). A camada trofoblástica ficou danificada durante a separação da interface materna. Historesina, HE. a) 50x (barra = 200µm), b) 200x (barra = 40µm), c) 1.000x (barra = 10µm) 88
- Figura 9 - Eletromicrografia de varredura. Projeções coriônicas após desconexão com o útero. Vê-se os vasos sanguíneos sobre a sua superfície. Esta disposição apresenta formato de rede complexa. Observar o pregueamento e ramificações das projeções coriônicas, bem como o reduzido espaço existente entre elas. Barras a) 300µm, b) 200µm, c) 100µm..... 89
- Figura 10 - Fotomicrografia. Reações histoquímicas na interface materno fetal, a) Reatividade de mediana intensidade da enzima fosfatase ácida, observada sob a forma de acúmulos irregulares de cor negra no trofoblasto. 100x, (barra = 40 µm), b) Reatividade PAS +, observada como uma linha cor lilás fortemente corada (seta), 100x (barra = 40µm), c) Também se evidencia reatividade PAS + no citoplasma das células trofoblásticas em forma de grânulos, assim como entre as junções de células trofoblásticas vizinhas, 400x, (barra = 20µm). 92

- Figura 11 – Fotomicrografia. Corte transversal das projeções coriônicas para mostrar a presença das fibras colágenas na base do mesenquima (m) e no interior das projeções coriônicas (seta). As fibras colágenas dispõem-se formando feixes no eixo central das projeções coriônicas. Vaso sanguíneo fetal (vf), vaso sanguíneo materno (vm). Paraplast, Tricrômico de Masson a) 100x (barra = 100µm), b) 100x (barra = 20µm), Picrosirius c) 100x (barra = 100µm), d) 200x (barra = 40µm)..... 93
- Figura 12 - Eletromicrografia de transmissão. a) Nota-se a intimidade entre a membrana basal da célula trofoblástica (ct) e do endotélio do vaso fetal (vf). Eritrócito (e), leucócito (l). 6.000x. b) membrana lateral entre dos células do trofoblasto evidenciando a união entre estas através de desmosomos (d). Núcleo (n). 20,000x 94
- Figura 13 - Eletromicrografia de transmissão. Trofoblasto (T) mostrando as microvilosidades na sua superfície apical (setas) e mesênquima (m) com vaso sanguíneo fetal (vf) com leucócito (l) e eritrócito (e) no seu interior. Mesênquima (m) com presença de fibras colágenas e fibroblastos (f). Observar as projeções do endotélio para o interior do lume. a) 1.500 x, b) 1.200x. 95
- Figura 14 - Eletromicrografia de transmissão. Trofoblasto (T) mostrando vesículas de diferentes tamanhos e eletrodensidades no citoplasma e núcleos de grande tamanho (n). Notar a proximidade entre vaso sanguíneo fetal (vf) e célula trofoblástica (ct). Microvilosidades (setas), mesênquima (m), fibroblastos (f). a) 1.000x, b) 5.000x. 96
- Figura 15 - Eletromicrografia. Fibras colágenas no mesênquima. Observar em a) reduzida quantidade destas fibras na periferia do interior das projeções coriônicas, em relação aos fibroblastos (f). 4.000x, b) a grande quantidade de fibras próximo das bases das projeções coriônicas (seta). 10.000x, c) disposição das abundantes fibras colágenas no eixo central das projeções coriônicas. 30.000x.. 97
- Figura 16 - a) Fotomicrografia do alantóide. Observar as células colunares, com núcleos basais e nucléolos fortemente basofílicos. Mesênquima com abundantes fibroblastos, b) Observar a linha de reborda basofílica na superfície apical das células (seta). Histoiresina, HE, a) 400x (barra = 10µm), b)1000x (barra = 10µm), c) Eletromicrografia de varredura. Vista do alantóide denotando uma superfície irregular com algumas áreas pregueadas. Os limites celulares apresentam contornos desde poliédricos até irregulares. Ressaltam estruturas salientes de formatos poligonais e ovais (setas). Outras estruturas são quase circulares formando depressões de menor tamanho e diâmetro (setas grossas), barra = 100µm. 99

Figura 17 –	Eletromicrografia de varredura. a) Alantóide, b) estruturas em alto relevo com formatos poligonais e ovais. Ao maior aumento estas apresentam-se volumosas e compostas de múltiplas pregas, de aspecto felpudo. Barras = a) 30µm, b) 10µm; c) e d) estruturas similares às anteriores, no entanto formando depressões, de diâmetro maior. Ao maior aumento elas mantinham a mesma aparência, ou seja eram formadas por pregas, com superfícies semelhantes à felpas, barras = c) 10µm, d) 3µm.	100
Figura 18 -	Fotomicrografias. a) Aréola. Observar o tamanho das aréolas quando comparado com as projeções coriônicas. Secreção PAS positiva. b) Observar a presença de material PAS positivo e os restos celulares. Paraplast, PAS, a) 200x (barra = 100µm), b) 400x (barra = 50µm).....	103
Figura 19 -	Fotomicrografias. a) Glândulas uterinas, em maior quantidade e desenvolvimento na proximidade das projeções coriônicas. Paraplast, HE, 50x, b) Observar o epitélio cilíndrico alto e os núcleos localizados na metade do comprimento celular. Vesículas claras na secreção do lume. c)Núcleos e citoplasma altamente basofílicos. Secreção na luz eosinofílica. Notar a presença de vesículas na luz das glândulas. Historesina, HE, b)400x (barra = 10µm), c) 1000x (barra=10µm), d) Corte semifino, Resina Araldite, 400x.	107
Figura 20 -	Fotomicrografias. Reações histoquímicas nas glândulas uterinas. Intensa reatividade da enzima fosfatase ácida em forma de grumos, de coloração vermelho-escuro, no lume glandular, e cobrindo toda a glândula. Paraplast, a) 25x , b) 400x (barra = 20µm), c) Notória reatividade à PAS no lume glandular. Grânulos eosinofílicos espalhados pelo citoplasma. 400x (barra = 20µm)	108
Figura 21 -	Fotomicrografias. Detecção da ferritina férrica pelo método de Azul de Perl's. Evidente reatividade ao nível da luz, e no citoplasma das células glandulares, sob a forma de pequenas granulações de tamanho menor do que os núcleos celulares, de coloração azul, quase preta. Paraplast, a) 40x (barra = 10µm), b) 100x (barra = 10µm), c) Detecção imunohistoquímica da utero ferrina com marcada intensidade no lume glandular denotada por uma cor marrom, assim como no citoplasma das células glandulares sob a forma de pequenos grânulos da mesma cor. Paraplast, 40x (barra = 20µm).....	109
Figura 22 -	Eletromicrografia de varredura. Glândulas uterinas (g). Observar a secreção ocupando quase a totalidade do lume glandular (seta). Notar os espaços que correspondem às vesículas. A trajetória sinuosa das glândulas está rodeado de tecido conectivo frouxo do endométrio e de fibras colágenas, a) 114,28x (barra = 10µm), b) 742,85x (barra = 10µm).	110

- Figura 23 - Eletromicrografia de transmissão das glândulas uterinas. a) Epitélio cilíndrico (E) com núcleos (n) grande. Observar grânulos de diferentes eletrodensidades e tamanhos, no núcleo e no citoplasma. No lume glandular (L) também existe material em formato de grumos de alta eletrodensidade, e vesículas de nula eletrodensidade, 400x, b) em alguns casos foi possível observar os núcleos rodeados por um halo de nula eletrodensidade, bem como a presença de microvilosidades na superfície apical das células (seta). 6.000x, c) detalhe de vesícula eletrodensa de posição supranuclear e presença de corpo de Golgi (G), 1.500x. 111
- Figura 24 - Eletromicrografia de transmissão. a) Presença de microvilosidades (setas) na superfície apical da célula glandular, 10.000x; b) célula mostrando cílios de grande comprimento em direção ao lume glandular (L). Estas células apresentaram menor eletrodensidade do que as outras células trofoblásticas, 10.000x. c) membrana basal com pregas de alta eletrodensidade. Observar que entre elas acham-se vesículas pequenas de baixa eletrodensidade, 25.000x. 112
- Figura 25 - Fotomicrografia. Membrana epidermal. Observar o epitélio estratificado composto por 7 ou mais camadas de células alargadas. A camada mais externa (setas) apresenta células aplanadas. Algumas células apresentam 2 ou 3 núcleos (*), enquanto que nas outras não se evidenciam a presença de núcleos. Paraplast, HE, a) e b) 1000x (barra = 10µm). 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características fetais dos espécimes de lhamas (<i>Lama guanicoe</i> glama) utilizados. Peru. 2004. T = dias de gestação, C = comprimento fetal em cm, P = peso fetal em gramas, S = sexo (M = macho, F = fêmea), Lp = líquido placentário em cc, Pp= presença de pêlo no feto, Dp = diâmetro biparietal fetal em cm.81
------------	---

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO EM CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS.....	26
2.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO EM FÊMEAS DE CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS	28
2.2.1 Estro ou cio	28
2.2.2 Ovulação e formação do corpo lúteo	28
2.2.3 Gestação e sobrevivência embrionária	29
2.2.4 Partos	31
2.3 DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS FETAIS.....	31
2.4 CÓRIO	39
2.5 CAPILARES FETAIS.....	43
2.6 ALANTÓIDE	44
2.7 ÚTERO	45
2.8 GLÂNDULAS UTERINAS	47
2.9 INTERFACE MATERNO-FETAL.....	49
2.10 ARÉOLAS	53
2.11 CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS	58
2.12 DETECÇÃO E TRANSPORTE DE FERRO PARA O FETO	59
2.13 MEMBRANA EPIDERMAL (QUARTA MEMBRANA)	65
3 MATERIAL E MÉTODO	66
3.1 MATERIAL	67
3.1.1 Equipamentos	67

3.2 MÉTODO.....	68
3.2.1 Confirmação e determinação do tempo da prenhez	68
3.2.2 Coleta do material biológico	68
3.2.3 Processamento do material para observação ao microscópio de luz	69
3.2.3.1 Inclusão em Paraplast®	69
3.2.3.2 Inclusão em Histoiresina® (glicol metacrilato)	70
3.2.4 Reações histoquímicas	70
3.2.4.1 Detecção da atividade do Ácido Periódico de Schiff (PAS)	71
3.2.4.2 Detecção da enzima fosfatase ácida	71
3.2.4.3 Detecção de ferro pelo método da Reação Azul de Prússia (Perl's)	71
3.2.5 Detecção imunoistoquímica da utero ferrina	72
3.2.6 Processamento do material para observação ultra-estrutural	72
3.2.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	73
3.2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	74
4 RESULTADOS	77
4.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS	78
4.2 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS	82
4.2.1 Cório	82
4.2.2 Alantóide	98
4.2.3 Útero.....	101
4.2.4 Aréolas	102
4.2.5 Glândulas uterinas	104
4.2.6 Membrana epidermal (quarta membrana)	113
5 DISCUSSÃO	115

5.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS	116
5.2 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	117
5.2.1 Cório	117
5.2.2 Alantóide	122
5.2.3 Útero	123
5.2.4 Aréolas	124
5.2.5. Glândulas uterinas	125
5.2.6 Membrana epidermal (quarta membrana)	127
6 CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS	131
APÊNDICES	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os camelídeos sul-americanos encontram-se dentro da Ordem dos Artiodátilos, compartilhando algumas características em comum com os ruminantes, tais como o estômago dividido em compartimentos e a regurgitação do alimento para uma segunda digestão, além de possuírem número par de dedos em cada membro. Existe entretanto uma diferença em relação a morfologia do estômago destes animais, já que eles têm um estômago mais simples do que os bovinos, ou seja, formado por três compartimentos. Faltam também nestes animais cornos. Eles possuem ainda verdadeiros dentes caninos separados dos dentes molares por um diastema. A anatomia dos membros pélvicos lhes permitem descansar sobre o ventre, com os joelhos dobrados, e tornozelos dispostos caudalmente.

No Peru encontram-se as quatro espécies de camelídeos sul-americanos conhecidos do mundo: guanacos, vicunhas, alpacas e lhamas, sendo as duas primeiras silvestres.

Desde tempos antigos estas espécies tem tido uma importância social e econômica nas sociedades andinas. Atualmente uma alta porcentagem das populações de lhamas encontra-se confinada à pequenos criadouros rurais pertencentes aos pequenos produtores das regiões da serra peruana. A comercialização destes animais e seus subprodutos (carne, pêlo e pele) constituem uma fonte de geração de recursos econômicos, os quais são essenciais para a subsistência e bem-estar dos povos andinos.

Mesmo assim, considerando a importância desta espécie, nem sempre as tecnologias utilizadas para a sua criação são especialmente aplicadas para fins

reprodutivos (FRANCO; PEZO; GARCIA, 1998). Além dos problemas de manejo da reprodução, estas populações de animais apresentam diversas doenças que afetam o sistema reprodutor, tais como: brucelose, sarcocistose, endometrites e toxoplasmose, sendo estas responsáveis por numerosos abortos e alto índice de mortalidade embrionária (GIDLEWSKI et al., 2000; LA PERLE et al., 1999; RAMÍREZ et al., 1998).

Estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor feminino nesta espécie são muito escassos e quando ocorrem são realizados a nível macroscópico, além de serem interpretados de maneira comparativa com outras espécies de camelídeos e outros artiodátilos. Estudos sobre os aspectos anatômicos microscópicos da placenta e sobre o mecanismo de placentação em lhamas são muito raros.

O objetivo de esta pesquisa é descrever aspectos histológicos, celulares e subcelulares da placenta de lhamas, focando o último terço da gestação.

Os resultados desta investigação acrescentarão conhecimentos essenciais ao tema, servindo para estudos futuros a serem realizados por equipes multidisciplinares, que trabalham no desenvolvimento de biotecnologias ligadas à reprodução.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura especializada em placenta de lhamas é escassa. Sendo assim, as informações revisadas neste trabalho incluem também publicações sobre placenta de outros camelídeos sul-americanos e camelos, e em outros animais que também possuem placenta epiteliocorial, como por exemplo, o eqüino, o suíno e os pecaris (cateto e queixada).

2.1 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO EM CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS

As lhamas têm a capacidade de começar a reprodução no primeiro ano de idade e produzir um filhote por ano regularmente, até os 12 ou 14 anos. Na prática, este potencial é sub-utilizado, já que na maioria dos rebanhos as fêmeas têm o seu primeiro filhote aos 3 anos de idade, e a taxa de natalidade em primíparas e adultas é de ao redor de 50% (NOVOA; LEYVA, 1996).

Os ovários dos camelídeos sul-americanos são pares e de formato ovalado, fixados pelo meso-ovário, envolvidos pela bursa ovariana. São de superfície lisa em fêmeas pre-púberes e de superfície irregular em estado reprodutivo pela presença de folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Nas alpacas podem medir: 15 mm de comprimento, 12 mm de largura e 9 mm de espessura. Os pesos variam de 2,4 $\pm$ 1,3 g o esquerdo, e de 1,9 $\pm$ 1,0 g o direito. Os ovidutos, na união com o útero têm um diâmetro de 2 a 3 mm, enquanto na proximidade ao ovário alarga-se com formato de funil, formando uma bolsa que envolve ao ovário (NOVOA; LEYVA, 1996).

Quando o ovário contiver inúmeros folículos em desenvolvimento pode se parecer ao ovário da porca, se tiver um corpo lúteo ativo o peso do ovário pode ser acrescentado de 60% a 100%. Os folículos podem atingir um diâmetro maior do que 4 mm, assim como o corpo lúteo; e estes se projetam sobre a superfície do ovário e são facilmente identificáveis. Folículos entre 5 e 12 mm são considerados normais, enquanto que folículos maiores são considerados patológicos. As tubas uterinas são longas e sinuosas, penduradas e fixas pelo mesosalpinge, de um comprimento médio de $20,4 \pm 4,2$ cm. O istmo que mede cerca de 2 a 3 mm de diâmetro, termina no corno uterino e internamente forma uma papila com um esfíncter bem definido. É impossível lavar a tuba uterina desde o corno uterino, mas o é possível no sentido oposto (SUMAR, 1989).

O útero apresenta uma mucosa lisa e consta de dois cornos e um corpo, ambos os lados do útero estão fixados nas paredes abdominais e pélvicas pelo ligamento largo (SUMAR, 1989). Em alpacas o corno esquerdo mede $7,9 \pm 1,3$ cm e o direito $7,4 \pm 0,9$ cm de comprimento. A parede medial ou velo uterino é de aproximadamente 2 cm de comprimento. O corpo uterino mede 1,5 cm de comprimento e 2,0 de largura. O colo do útero contém 03 ou 04 pregas anulares. O canal cervical é sinuoso, de 2 a 3 cm de comprimento. A vagina mede entre $13,4 \pm 2,0$ cm de comprimento. A rima vulvar tem orientação ventro-dorsal e tem 3 a 4 cm de comprimento. A comissura dorsal da vulva é ligeiramente arredondada e está a 2 ou 3 cm do orifício anal, enquanto a comissura ventral é aguda e termina numa projeção cônica (NOVOA; LEYVA, 1996).

2.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO EM FÊMEAS DE CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS

A fisiologia reprodutiva de todos os camelídeos sul-americanos é muito semelhante, especialmente entre lhamas e alpacas as quais são espécies domésticas.

2.2.1 Estro ou cio

Alpacas e lhamas não têm ciclos sexuais definidos como em outras espécies de ruminantes domésticos como vacas e ovelhas. Os ciclos de atividade folicular duram aproximadamente 13 dias, podendo apresentar cio independentemente da fase do desenvolvimento folicular em que a fêmea possa se encontrar (crescimento, maturidade ou regressão ou atresia) (NOVOA; LEYVA, 1996).

2.2.2 Ovulação e formação do corpo lúteo

Os camelídeos sul-americanos são animais de ovulação induzida, requerendo o estímulo efetivo da penetração do pênis; sendo por isso que a monta sem penetração resulta em baixas porcentagens de ovulação. Esta ovulação acontece entre as 26 horas e 46-48 horas pós-coito. Somente folículos maiores de 7 mm respondem com níveis adequados de LH para produzir a ovulação. Uma baixa porcentagem, 8-15% em lhamas, e 5% em alpacas, podem ovular espontaneamente sem o estímulo do coito, provavelmente por estímulos visuais, auditivos ou olfatórios (NOVOA; LEYVA, 1996).

O incremento dos níveis de progesterona acontece no quarto dia pós-fecundação, tornando-se máximo no oitavo dia pós-serviço. Durante os dias 10-11 acontece uma diminuição transitória em grávidas, depois recupera os níveis altos para manter-se alta durante a prenhez (NOVOA; LEYVA, 1996). De 110 animais 54,5% tinham o corpo lúteo ativo no ovário direito, 44% no ovário esquerdo e 0,9% apresentaram o corpo lúteo em ambos os ovários. Das 48 fêmeas com o corpo lúteo ativo no ovário esquerdo, 97% apresentavam o feto no corno uterino esquerdo, em 100% dos casos com corpo lúteo funcional no ovário direito, o feto se encontrava localizado no corno uterino esquerdo. Segundo estes resultados o ovário direito mostra uma maior atividade ovulatória julgada através da presença do corpo lúteo. A única fêmea com corpo lúteo ativo em cada ovário apresentou um só feto no corno esquerdo (SUMAR; LEYVA, 1979).

2.2.3 Gestação e sobrevivência embrionária

A gestação em lhamas dura aproximadamente 11,5 meses. Estudando o tempo de gestação em lhamas primíparas e adultas, determino-se em $346,45 \pm 8,04$ e $345,03 \pm 6,25$ dias respectivamente. As primíparas que gestaram filhotes fêmeas usaram mais três dias do que as que gestaram filhotes machos, não existindo esta diferença nas adultas (CONDOREMA et al., 1988). O corpo lúteo é vital para o mantimento da prenhez, tal como foi demonstrado ao fazer a remoção cirúrgica do ovário contendo o corpo lúteo ou a enucleação do mesmo, acontecendo aborto em todos os animais operados, em fêmeas operadas aos 11 meses de gestação ocorria o nascimento de filhotes com baixo peso ou alta taxa de mortalidade (SUMAR, 1988).

O nível de progesterona declina 2 semanas antes da parição. Mesmo assim a atividade ovulatória de ambos os ovários é similar, a implantação dos embriões é feita no corno uterino esquerdo (FERNÁNDEZ-BACA et al., 1979; NOVOA; LEYVA, 1996). Em alpacas, acharam que 98,4 % das fêmeas entre os quatro a dez meses de prenhez, o feto esteve localizado no corno esquerdo (FERNÁNDEZ-BACA et al., 1973).

A maior implantação de embriões no corno esquerdo revela condições mais favoráveis para o desenvolvimento do embrião, afirmando que a migração ao corno esquerdo obedece à necessidade da sobrevivência do zigotos que procedem do corno direito; enquanto as migrações em sentido oposto são muito menores. Estes resultados são similares aos achados em alpacas (SUMAR; LEYVA, 1979).

O método de diagnóstico de prenhez é da palpação externa, outro método é por palpação retal, que na lhama é de fácil execução, com treinamento prévio, e é muito preciso (FRANCO; PEZO; GARCIA, 1998); outros métodos incluem observação do comportamento, análise de progesterona e ultra-sonografia (FOWLER; BRAVO, 1998).

Tem-se demonstrado que ao redor de 50% de fêmeas prenhas perdem o embrião durante os 30 primeiros dias de gestação. A partir do sétimo mês de gestação o crescimento fetal é exponencial, assim que o 70% do peso do filhote ao nascimento acontece neste período (NOVOA; LEYVA, 1996). Neste último terço de gestação, entre os meses de julho ao dezembro principalmente, também se produz o incremento dos envoltórios fetais. Este fato coincide com a pouca disponibilidade de forragem o qual pode repercutir em baixos pesos ao nascimento e pouca sobrevivência dos filhotes (BUSTINZA; GALLEGOS; SANTOS, 1970).

2.2.4 Partos

Acontecem entre as 6:00 e 14:00 horas, sendo a maior incidência entre as 8:00 e 12:00 (BUSTINZA; GALLEGOS; SANTOS, 1970; SUMAR et al., 1978). Similarmente às outras espécies, em alpacas no feto incrementam-se os níveis de cortisol plasmático imediatamente antes e durante o parto; é possível que esta substância tenha um rol no começo do parto. Embora não se conhecem os mecanismos que estimulam aos animais a parir dentro deste horário, também não os mecanismos maternos que o controlam (NOVOA, 1991). O parto se produz em três fases. A primeira se caracteriza pelas contrações abdominais, as quais indicam o início do processo de dilatação cervical, coincidindo com a aparição da bolsa amniótica e as patas e focinho do filhote pela vulva. Esta etapa dura aproximadamente entre 45-180 minutos e termina com a saída da cabeça e membros torácicos fora da vulva.

Na segunda fase se produz a expulsão do feto, com a fêmea em posição de pé geralmente, dura entre 10-40 minutos. Finalmente, se produz a expulsão da placenta entre os 30-120 minutos posteriores. A placenta não é decídua (NOVOA; LEYVA, 1996; STEVENS et al., 1980).

2.3 DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS FETAIS

A placenta dos mamíferos eutérios (todos os mamíferos, exceto os marsupiais e os monotremas) é uma estrutura que se forma pela aposição de membranas fetais e tecidos maternos. A principal função consiste em regular a troca fisiológica entre o feto e a mãe, embora também atua como importante órgão endócrino durante a

gestação. Os tecidos placentários, em especial os de origem fetal, estabelecem uma barreira para evitar a mistura do sangue fetal e materna (NODEN; DE LA HUNTA, 1990).

A placenta de tipo vilosa difusa foi observada em perissodátilos como o cavalo, burro, zebra e em cetáceos como o golfinho, e em alguns artiodátilos como em lhamas, camelos e cervídeos (DANTZER, 2002). Além da lhama, os outros camelídeos sul-americanos têm uma placenta que também têm sido classificada como difusa e epitélio-corial, já que são seis camadas presentes, isto indica que as camadas de oposição fetal e materna são o epitélio uterino e o epitélio coriônico, respectivamente (LATSHAW, 1987). Este tipo de placenta é similar também em éguas e suínos, embora as membranas fetais dos camelídeos têm características particulares (FOWLER; BRAVO, 1998; STEVENS et al., 1980). Afirma-se que além dos ungulados, a placenta epitélio-corial está presente em grandes animais com longos períodos de gestação, como as baleias, sendo a presença de capilares na endentação do trofoblasto e do epitélio uterino importante para diminuir a distância interhemal (ENDERS; CARTER, 2004).

Observou-se na placenta de alpaca que a distância da interdigitação entre os microvilos do feto e da face materna parecia muito menor do que em outros ungulados, hipotetizando isto como uma adaptação as grandes alturas (STEVENS et al., 1980). Por apresentar este tipo de placenta, a sua retenção depois do parto é difícil em camelídeos sul-americanos (CALLE, 1982). A característica difusa da placenta em alpacas está dada pelos capilares maternos e fetais que endentam o epitélio e o trofoblasto, limitando as áreas de troca, as quais acontecem ao longo da inteira interface materno-fetal (OLIVERA et al., 2003b). Em alpacas observou-se a superfície uterina interna sem depressões ou áreas carunculares específicas como

as descritas para vacas, ovelhas e cabras (BUSTINZA, 1961).

São quatro estruturas membranosas as que estão envolvidas no desenvolvimento placentário: o cório, o âmnio, o saco vitelínico e a bolsa alantóica. O cório é uma camada epitelial derivada da parede blastocítica externa, o trofoblasto.

Durante o desenvolvimento da implantação, ésta é completada por uma camada interna de mesênquima que deriva do embrião. Logo em seguida, a mesênquima desenvolveu seu próprio sistema capilar. Em muitas espécies, o epitélio coriônico ou trofoblasto, como a camada mais externa da unidade feto-placentária representa a decisiva barreira de troca entre os organismos maternos e fetais. O âmnio é derivado do ectoderma embrionário. Como o cório, esta membrana age como uma mesênquima de suporte, mas nunca desenvolve vasos. O âmnio rodeia o embrião ou feto como uma segunda camada interna, mas nunca substitui o cório da bolsa membranosa do ovo como a mais extrema membrana embriônica. Por causa disto, pode agir como uma adicional, mas nunca a única barreira materno-fetal. A terceira membrana, o saco vitelino, consiste de uma camada de epitélio endodérmico acompanhado por mesênquima fetalmente vascularizado (vasos vitelinos). Em alguns mamíferos (artiodátilos e primatas) o saco vitelino é uma estrutura rudimentar que geralmente não participa da troca materno-fetal. Em outras espécies ela se funde localmente com o cório, conectando assim partes de sua base capilar via vasos vitelinos com o feto (placenta cório-vitelina), como acontece em perissodátilos e carnívoros. A quarta membrana, o alantóide, se desenvolve a partir do intestino embrionário (endoderme) como um saco extraembrionário. O mesênquima é ricamente vascularizado (vasos alantoícos). Em todos os mamíferos, os últimos se fundem com a base capilar coriônica e conecta o último tanto em parte ou completa à circulação embriônica (placenta corio-alantoica), é claramente envolvido nos

processos de troca transplacentária (LEISER; DANTZER, 1994).

O cório quando se funde com o alantóide para formar o alantocório ou placenta corioalantoica, continua sendo funcional para o tempo restante da gestação. As funções gerais do alantocório estão dirigidas a servir como uma interface para a absorção de nutrientes provenientes das secreções uterinas maternas, troca de micro-nutrientes (por exemplo, aminoácidos, água, eletrólitos e glicose) e gases provenientes do sistema materno, secretar hormônios protéicos e esteroídeos, secretar fatores de desenvolvimento necessários para o crescimento e desenvolvimento do útero e a unidade feto-placenta, secretar moléculas matrizes extracelulares que permitem a ligação placentária da parede uterina, e participar na proteção do conceito da rejeição pelo sistema imune materno (BAZER, 1999).

O desenvolvimento inicial das membranas fetais em camelídeos desde a fase de blastócito até a fixação no útero, não é comum. Entre os 70–90 dias, a superfície do cório começa apresentar numerosas projeções arredondadas que encaixam em correspondentes depressões na mucosa uterina. A ligação é tênue e o cório pode ser descolado da mucosa sem resistência (FOWLER; BRAVO, 1998; FOWLER; OLANDER, 1990). Nos camelos, nesta fase o embrião está encerrado no interior de uma vesícula amniótica a qual está boiando livremente no interior do alantocório, ligado ao alantóides pelo cordão e vasos umbilicais (MUSA; ABU SINEINA, 1976).

Em alpacas o líquido fetal é abundante no começo da gestação em proporção ao tamanho do embrião, mas diminui na prenhez avançada. O líquido alantoideo não apresenta a turbidez nos outros ruminantes e eqüinos, sendo de cor âmbar cristalino e limpo (BUSTINZA, 1961). O fluido amniótico da lhama contém resíduos líquidos da gestação, como nos camelos, produzindo uma superfície escorregadia sobre a membrana epidermal que facilita o parto. Em contraste, o fluido amniótico das éguas

e vacas se torna mucoso a través do final da gestação, isto também, como lubrificante do feto e facilitar o parto (FOWLER; OLANDER, 1990). Mudanças microscópicas podem ser identificadas junto ao comprimento fetal de 17 cm ou aproximadamente a metade da gestação. O espessamento do âmnio não acontece até depois do desenvolvimento do pelo, e aparece nos últimos dois meses da gestação.

Estudos sobre a implantação e a placentação inicial nos dromedários, chegaram a determinar que por volta do dia 14 o trofoblasto tinha o aspecto de uma delgada camada de células epiteliais sobrepostas e muito perto do epitélio endometrial. Presença de microvilos foi observada na superfície apical do trofoblasto e do epitélio do lume uterino onde as células não se pousavam. Todas as etapas de desenvolvimento destes microvilos puderam ser vistas em diferentes áreas do conceito nesta etapa de gestação. Perto do dia 25 uma bem desenvolvida junção microvilar foi formada entre os tecidos maternos e fetais, enquanto que aos 35 a 56 dias, histologicamente, células trofoblásticas gigantes multinucleadas tinham se desenvolvido de forma freqüente, mas a intervalos irregulares no comprimento do trofoblasto, e a junção de microvilos entre as células trofoblásticas colunares e o epitélio endometrial era mais uniforme e mais estabelecido do que as etapas previas. As células gigantes trofoblásticas foram freqüentemente achadas sobre a abertura das glândulas endometriais (SKIDMORE; WOODING; ALLEN, 1996).

Em dromedários também se estudaram as formações de placenta nos conceitos de 2,5 ao 26 cm de *crown rump lengths* (CRL). Nos estágios iniciais da prenhez (2,5 – 4,5 cm CRL) descreveram três formas de inter-relação materno-fetal: pré-contato, onde as células trofoblásticas mononucleares estiveram separadas do epitélio uterino por uma brecha contendo histotrofo interareolar. Ambos os epitélios

fetal e materno desenvolveram um material ectoplásmico apical nesta localização. A segunda forma de inter-relação foi a aposição, onde os microvilos da membrana celular apical do trofoblasto contataram o epitélio uterino focalmente. Células gigantes trofoblásticas multinucleadas se desenvolveram ao lado da população ainda presente de células trofoblásticas mononucleares. O material ectoplásmico uterino pode ser observado. A terceira fase descrita foi a adesão, a qual acontecia quando as membranas celulares apicais dos epitélios fetais e maternos se aderem muito perto, formando desta maneira um espaço intercelular “normal” de 20 nm de largura sem nenhuma intervenção do espaço do lume uterino (ABD-ELNAEIM et al., 1999).

Além disso, o estudo demonstrou uma adesão semi-dentada quando os microvilos trofoblásticos faziam contacto íntimo com as membranas não microvilosa das células apicais uterinas. Com 10 a 13 cm CRL uma ancoragem adicional da placenta ao endométrio foi realizado pelo crescimento de pregas temporárias e depressões do alantocório e do endométrio, os quais se endentavam mutuamente numa maneira complementar. A altura destas estruturas, ranhuras e crestas, se incrementaram gradualmente em conceitos de 14 ao 18 cm CRL, podendo-se alargar ao redor dos 25 cm de CRL. Esta união cria uma unidade responsável da ancoragem feto-materno e ao mesmo tempo garante uma troca metabólica para as necessidades crescentes do desenvolvimento fetal (ABD-ELNAEIM et al., 1999).

Observou-se em alpacas que no dia 22 após o coito, já se inicia o processo de implantação, e o trofoblasto está em contato íntimo com o epitélio uterino. As células epiteliais uterinas estavam representadas por células colunares exibindo curtos e irregulares microvilos que se amoldavam perfeitamente, mas de maneira descontínua às projeções apicais das células trofoblásticas, caracterizando, possivelmente o início do estágio de adesão do processo de implantação

embrionário. Algumas células epiteliais formavam grupos salientes que podiam estar relacionadas à adesão materno-embriônica. Estas células apresentavam núcleo eucromático, nucléolo proeminente e citoplasma rico em organelas: abundante retículo endoplasmático e cisternas de aparelho de Golgi. Estas características indicaram células em intensa atividade de síntese. Grânulos pequenos foram abundantes particularmente no citoplasma apical de todas as células epiteliais. No dia 26 e 30 após o coito, muitas das células epiteliais aumentaram suas dimensões e assumiram um aspecto fungiforme (OLIVERA, 1998).

As células trofoblásticas em alpacas apresentaram características de células muito ativas contendo grande quantidade de vesículas PAS + e eletrodensas por todo o citoplasma. Atividade endocítica esteve presente nas células trofoblásticas e muitas imagens foram sugestivas de que ocorre passagem de material materno para o organismo embrionário. A interface de contacto epitélio-trofoblasto se apresentou mais elaborada com interdigitações mais abundantes e de modo contínuo. Frequentemente, no estreito espaço intercelular existente entre estes tipos de células foi possível observar a presença de um material PAS +, eletrodenso. Esta interface ocorria ao longo do contato entre as membranas fetais e o endométrio e, da forma como se apresentava parecia caracterizar uma típica fase de adesão. Aos 45 dias após o coito, células binucleadas foram observadas comumente tanto no epitélio uterino quanto na camada do trofoblasto. Células em processo de degeneração e descamação também foram observadas. As células trofoblásticas frequentemente exibiram sinais de fagocitose das células epiteliais em degeneração. Não se observou invasividade do epitélio uterino por parte do trofoblasto. Na medida que a gestação progredia as glândulas uterinas tornaram-se menos numerosas, a espessura do endométrio se reduzia e os capilares sub-epiteliais foram mais

freqüentes e próximos da lâmina basal do epitélio (OLIVERA, 1998; OLIVERA, 2003a).

O estudo e análise do metabolismo e síntese de substâncias do trofoblasto podem ajudar a explicar as mudanças durante a evolução e especiação dos animais, assim como os mecanismos implicados na produção de híbridos. Estudos entre o cavalo (*Equus caballus*) e o burro (*Equus asinus*) mostraram modelos de glicosilação geralmente muito similares entre os tecidos placentários, contudo muito diferentes em quantidade e qualidade quando comparados com o camelo, apesar de ter o mesmo tipo de placenta. Estes resultados são consistentes com a preposição que o cruzamento entre espécies leva glicanos similares nos tecidos placentários formando a barreira interhemal, onde a glicodiversidade é um dos fatores preventivos da implantação e desenvolvimento placentário subsequente em híbridos interespecíficos (DICKERSON; SOUTHGATE; KING, 1967; JONES et al., 2000; KING, 1967).

Em estudos similares comparativos entre o camelo (*Camelus dromedarius*) e alpaca (*Lama pacos*) se acharam diferenças qualitativas na glicosilação tecidual, especialmente no trofoblasto, entretanto se observou uma maior conservação destes processos nos tecidos maternos, mas como uma maior diferença quantitativa em sua distribuição, indicando que os tecidos uterinos são mais conservados do que o trofoblasto com respeito à processos de glicosilação. É possível que estas diferenças sejam responsáveis pela normal complementação entre os tecidos materno e fetal durante os processos de implantação para estabelecer uma prenhez viável nestas duas espécies (JONES et al., 2002).

Outros estudos comparativos entre o porco (*Sus scofra*), duas espécies de pecaris (*Tayassu tajacu* e *Tayassu pecari*) e o dromedário (*Camelus dromedarius*), a maior parte das diferenças achadas foram mais quantitativas do que qualitativas

entre as espécies de suínos, no entanto muito diferentes entre estas e o camelo. Isto demonstra mais uma vez que a glicosilação da interface materno-fetal de espécies relacionadas, neste caso suínos e pecaríes, têm se mantido similar durante a evolução destas espécies, ao contrário do dromedário, que tendo também uma placenta epitelicorial com uma estrutura similar, a expressão de glicanos é diferente, sugerindo uma modificação das glicosil transferasas durante a evolução (JONES et al., 2004).

Em humanos, o âmnio, consiste de uma simples camada de células epiteliais e uma fibrosa lâmina desprovida de vasos sanguíneos. A superfície lineal do epitélio amniótico era vencida em algumas áreas por irregulares excrescências chamadas carúnculas amnióticas (HOANG-NGOC MINH et al., 1979)

Em alpacas e lhamas, ao término da gestação o feto está localizado no interior do corno gestante e no corpo do útero. O saco amniótico ocupa até os extremos dos ambos os cornos uterinos, e ocupa todo o espaço não ocupado pelo saco alantóide. O âmnio pode ser facilmente separado desde o lado fetal do cório. A fixação do âmnio ao alantóide ou cório é muito mais forte e permanece com estas estruturas na hora do parto. Nesta fase de gestação é possível achar uma quantidade mínima de fluido no saco amniótico (FOWLER; BRAVO, 1998; FOWLER; OLANDER, 1990).

2.4 CÓRIO

Em estudos sobre placenta de alpacas foram achados diferentes tipos celulares na camada trofoblástica: células uninucleadas, binucleadas e gigantes, estas últimas com forte afinidade pelos corantes básicos. Todas unidas entre si por meio de junções. Aos 150 dias de prenhez observou-se ao microscópio de luz o

trofoblasto como uma camada única com muitas figuras de mitose, eventuais células binucleadas. Na região basal da grande maioria de células foi possível observar pequenos acúmulos de material PAS +, estes se apresentaram em maior quantidade quanto maior o tempo de prenhez. Eventualmente observaram-se células de grandes proporções, contendo núcleos grandes e numerosos nucléolos. Ultra-estruturalmente estas mostraram características de ser células produtoras de proteínas, mitocôndrias de forma alongada distribuídas principalmente na região apical, cisternas do retículo endoplasmático granular, polirribossomos e ribossomos livres eram abundantes, assim como cisternas e vesículas associadas ao aparelho de Golgi. As células trofoblásticas vizinhas tinham junções de tipo desmossoma e interdigitações de membrana, as quais foram maiores em células trofoblásticas gigantes. Grânulos de diferentes tamanhos, algum dos quais muito pleomórficos foram observados e situados, maiormente na parte basal das células, entretanto que pequenas vesículas foram achadas no ápice das células trofoblásticas. (JONES et al., 2002 ; OLIVERA, 2002).

Em placentas citotrofoblásticas do camelo bactriano foram achadas células gigantes poliplóides resultantes da diferenciação de células citotrofoblásticas normais. Esta transformação é realizada via poliploidização endomitótica e reflete a atividade sintética dos processos que acontecem nestas células relacionadas com a função trófica da placenta. Estes achados podem supor que células gigantes da placenta do camelo bactriano também participam da função endócrina da placenta. A função histolítica é completamente excluída (GOROKHOVSKII et al., 1975). Acredita-se também que a formação de células trofoblásticas gigantes se produz por mitose na ausência de citocinese à semelhança dos megacariócitos (ABD-ELNAEIM et al., 1999); enquanto também se sugere que podem surgir como resultado da fusão de

células trofoblásticas mononucleadas contíguas formando sincícios (SKIDMORE; WOODING; ALLEN, 1996). Em alpacas, não se observaram sinais coerentes com fusão entre células ou endomitose, mas por vezes se acharam células gigantes com um único pacote cromossômico em mitose (OLIVERA, 2002), o qual corrobora com os achados em dromedários (ABD-ELNAEIM et al., 1999).

O trofoblasto uninucleado da placenta epiteliocorial dos camelos (*Camelus dromedarius*) começa a produzir células gigantes multinucleadas entre o dia 30 e o dia 35 da prenhez. Estas células gigantes foram achadas dispersas ao longo do trofoblasto com similar freqüência durante a gestação. Ultra-estruturalmente o citoplasma destas células continha muitas mitocôndrias, mas a organela predominante no ápice celular foram túbulos e vesículas do retículo endoplásmico liso, por todo o citoplasma, freqüentemente em grandes grupos. Observou-se também uma zona acima do núcleo onde pequenas pilhas de Golgi eram concentradas entre o retículo endoplásmico liso, assim como ocasionais cisternas do retículo endoplásmico rugoso espalhados por todo o citoplasma. Em cada célula gigante foram achados mais de um tipo nuclear, sendo alguns deles bizarramente multilobulados. O padrão de organelas não mostrou mudanças notórias durante a gestação. Não houve indicação de qualquer atividade fagocitária pelas células gigantes, com só umas poucas lisossimas espalhados por todo ou só na base das células. As células trofoblásticas uninucleadas tinham muito mais cisternas de retículo endoplásmico rugoso do que as células gigantes, mas menor quantidade de membranas do retículo endoplásmico liso. Estas células tinham um simples e usualmente esférico núcleo, um corpúsculo de Golgi supranuclear e mitocôndrias espalhadas por toda a célula. Ao contrário das células gigantes, as células trofoblásticas uninucleadas tinham lisossomas com muitos perfis, usualmente basal

ao núcleo, e uma malha de vesícula e túbulos imediatamente inferior aos microvilos apicais, o qual pode ser provavelmente relacionado na toma de nutrientes pelo feto (WOODING et al., 2003).

Em outros estudos também no camelo (*Camelus dromedarius*), as células gigantes trofoblásticas foram observadas em alguns espécimes com gestações entre 60 até 375 dias, exibindo também muitos perfis nucleares. Porém estas células foram mais prevalentes em alpacas (*Lama pacos*), com muitas células gigantes freqüentemente visíveis numa simples seção, e de maiores dimensões na última fase de gestação (JONES et al., 2002; OLIVERA, 2003b); enquanto que segundo o observado em placentas de alpacas a termo, as células gigantes multinucleadas eram relativamente escassas (BUSTINZA, 1961).

Os capilares coriônicos progressivamente ocuparam os espaços de células trofoblásticas vizinhas. Os vários tipos de células trofoblásticas e áreas especializadas da interface materna fetal dão às microrregiões da placenta funções onde a nutrição histiotrófica, a produção de hormônios e as trocas moleculares são importantes (OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a).

A presença de fibroblastos e macrófagos foi maior nas etapas de gestação tardias. Nas projeções coriônicas mais desenvolvidas o mesênquima apresentava feixes espessos de fibras colágenas e vasos fetais mais desenvolvidos. Os macrófagos eram mais numerosos no ápice das projeções coriônicas e mostravam prolongamentos de aspecto digitiforme (OLIVERA, 2002).

2.5 CAPILARES FETAIS

Em placenta de camelos e alpacas, os vasos sanguíneos foram observados subjacentes às células do epitélio uterino e também endentando o trofoblasto (JONES et al., 2002).

Na placenta de alpaca os capilares fetais observaram-se em contacto com as células trofoblásticas, sendo este contacto maior em idades de gestação avançada, chegando-se a observar em algumas regiões as lâminas basais do trofoblasto e do endotélio como uma lâmina única comum às duas estruturas. Este contacto se deve á intrusão de estruturas vasculares por entre as células trofoblásticas produzindo uma compressão destas células. Ultra-estruturalmente as células endoteliais eram pobres em organelas, apresentando escassa quantidade de cisternas do retículo endoplasmático granular e mitocôndrias. Também observou que a maior tempo de prenhez foi evidente a intrusão dos vasos fetais na camada trofoblástica, produzindo em alguns casos a redução da grossura do citoplasma das células trofoblásticas. As células trofoblásticas eram mais numerosas, predominantemente na região distal das projeções coriônicas, apresentando estas células inumeráveis e regulares microvilos na superfície apical. Também o citoplasma das células multinucleadas estava quase completamente preenchido por ribossomos e polirribossomos, além de que poucas granulações eletrodensas eram observadas (OLIVERA, 2002).

A distância entre os capilares fetais e maternos em alpacas é menor do que em outras espécies com o mesmo tipo de placenta epitélio-corial, tais como eqüinos e suínos (AMOROSO, 1952; LEISER; DANTZER, 1988; OLIVERA, 2002).

2.6 ALANTÓIDE

O alantocório dos camelídeos contém o fornecimento vascular fetal. A superfície do cório gradualmente muda desde as arredondadas projeções até papilas multifoliadas. As papilas variam em tamanho e forma, mas geralmente a base é menor do que a ponta. Eles podem ser colunar, retangular, ou apresentar formas cônicas invertidas e são de 0,25-1,5 mm de comprimento (FOWLER; BRAVO, 1998). Na alpaca, descreveu-se o alantocório como um saco que toma a forma do útero em gestação e com a face externa de cor vermelha. Em alpacas, as membranas fetais podem se desprender manualmente com muita facilidade da parede uterina durante qualquer fase da prenhez, e não se observam líquidos intermédios entre as porções materna e fetal, tal como se observa nas áreas intercotiledonárias de outros ruminantes e nos eqüinos (BUSTINZA, 1961).

Em eqüinos, suínos, bovinos e ovinos, têm se descrito a presença de massas claras ou marrom escuro, circulares ou ovaladas, de restos celulares e secreções uterinas, as quais tornam-se depósitos no alanto-córion ou bóiam livres no fluido alantoideo, estas estruturas são denominadas de hipomanes. Estas podem formar evaginações em direção ao saco alantóide para formar pedúnculos os quais podem ser eventualmente despendidas para boiar livres no fluido alantóide. Os hipomanes parecem ser materiais cheios de concentração granular de resíduos celulares, glóbulos gordura, hemácias degeneradas e secreções uterinas, sua função no entanto é desconhecida (BAZER, 1999; DICKERSON; KING, 1967; SOUTHGATE; KING, 1967).

Nos suínos, o endoderma alantóideo exibe uma atividade secretora glandular e difere notoriamente das dos outros mamíferos. Na superfície deste epitélio cuboidal

unilaminar, a maioria das células mostraram características curtas projeções vermiformes, onde algumas células sobressalentes apresentaram largos microvilos individuais. Estes dois tipos celulares eram também distintos em seções delgadas. Ao microscópio eletrônico de varredura o epitélio alantoideo revelou que a morfologia da superfície endodermal do alantocóron e alanto-amniótica foram muito similares. As células poligonais, geralmente penta ou hexagonal tinham usualmente um diâmetro de quase 10 micras. O sítio das complexas junções apicais é claramente marcado por proeminentes projeções, composta de uma dobra ou tripla prega consecutivas de curtos microvilos, mais esguios do que outros na superfície luminal. As projeções microvilosas curtas representam a única aparente especialização da superfície do endodermo alantoideo. Só uma pequena proporção deles observaram-se como simples projeções; a maioria é fusionada e formam curtas filas de projeções anastomóticas irregulares. Entre as células ranulares da superfície endodermal do alantóide foram possível observar três tipos de conspícuas saliências celulares apicais. Seus numerosos microvilos foram predominantemente vistos como simples projeções, curtas e diretas, ou longos e vermiformes. Estas estruturas foram sempre menores do que as das células granulares, correspondendo a células ricas em mitocôndrias achadas na microscopia de transmissão (TIEDEMANN, 1979).

2.7 ÚTERO

Na placentação epitélio-corial não existe uma invasão do trofoblasto do alantocóron para o interior do endométrio materno. Este tipo de placenta alantocoriônica mantém todas as camadas de tecidos: endotélio materno, tecido conectivo, epitélio uterino, trofoblasto, mesênquima e endotélio fetal, e desenvolvem

células decíduais, de modo que as camadas de tecidos não maternos são soltos após parto (DANTZER, 2002).

Com respeito às mudanças no útero, observou-se, que o epitélio uterino em alpacas mostrava-se sob a forma de um epitélio pavimentoso muito delgado, e o endométrio com projeções em diversos graus de desenvolvimento, tornando-se mais delgadas em maiores idades de prenhez, assim como a redução da região profunda do endométrio. Ao microscópio eletrônico de varredura a superfície uterina apresentou depressões em diferentes graus de desenvolvimento onde encaixavam as projeções do trofoblasto. Durante as diversas idades de gestação as variadas espessuras de superfície endometrial guardavam proporcionalidade com as do cório (OLIVERA, 2002).

Mas nos últimos períodos de prenhez de alpaca, se observa um incremento progressivo na profundidade das dobras na superfície da mucosa uterina junto com uma redução da espessura do endométrio, assim como do epitélio uterino o qual se mostrou ainda mais delgado quando em contacto com as células trofoblásticas gigantes. Ultra-estruturalmente as células epiteliais apresentaram características de intensa atividade celular, contendo numerosas mitocôndrias, poliribossomos e cisternas do retículo endoplasmático granular espalhados por todo o citoplasma. O citoplasma era mais eletrodenso (OLIVERA et al., 2003a).

Em camelos (*Camelus dromedarius*), ultraestruturalmente o epitélio materno contém uma população de pequenas gotas secretoras arredondadas supranucleares. Células binucleadas também foram achadas no epitélio uterino, geralmente no ápice das pregas, onde as células eram compridas e mais claramente definidas, e provavelmente seja indicativo de recente divisão celular. Pequenas estruturas puderam ser vistas no citoplasma epitelial materno, sob a forma de grânulos, alguns

dos quais formaram uma proeminente linha imediatamente subjacente à interdigitação da membrana de microvilos, enquanto que as células do trofoblasto estiveram claramente polarizadas. Finos grânulos apicais e um bem definido corpúsculo de Golgi central também foram observados (ABD-ELNAEIM, 1999; JONES et al., 2004).

Para o estroma endometrial distinguiram-se duas áreas diferentes delimitadas pela quantidade de células, fibras e pela presença de vasos sanguíneos. Próximo à interface materno-fetal e entre as projeções do cório o estroma endometrial estava formado por um tecido conjuntivo tipicamente frouxo, enquanto que o tecido conjuntivo interglandula, próximo ao miométrio, era formado por um tecido conjuntivo pouco celular com abundante matriz extracelular. Fibras colágenas estavam dispostas em forma concêntrica, entrecruzando-se no seus ápices formando feixes dispostos em camadas, enquanto em regiões mais profundas do estroma endometrial os feixes de colágeno eram menos abundantes e dispersos em uma maior quantidade de material amorfo. O estroma endometrial tornou-se mais delgado quanto maior era o tempo de prenhez. No interior das projeções os feixes eram menores aos 347 dias de prenhez (OLIVERA, 2002).

2.8 GLÂNDULAS UTERINAS

Em catetos e queixadas, as glândulas uterinas foram descritas como simples, tubulares e ocupando as áreas entre o epitélio materno e a túnica muscular. A glândula foi subdividida morfológicamente em duas partes: ducto secretor, caracterizado por células menores e ciliadas, e a porção secretora com células altas e basófilas. Nas regiões próximas às aréolas os ductos abriam-se secretando seu

produto. O epitélio glandular apresentou grandes núcleos basais e cromatina frouxa nos nucléolos, indicando alta atividade metabólica. O pólo apical destas células possuía microvilos. Acharam-se nestas espécies uma reatividade PAS+ no citoplasma glandular, assim como no lume da glândula. A reação positiva de Perl's para a detecção de ferro observou-se como grânulos de cor azul no citoplasma, mostrando em algumas células basais maior atividade secretora (SANTOS, 2002).

Em placentas de gestação avançada de alpacas se descreve a presença de abundantes glândulas muito dilatadas, de luz ovóide, circula ou alongadas, cheias de uma substancia homogênea de reação eosinofílica, sendo o contorno dos segmentos glandulares próximos ao epitélio endometrial muito tortuoso (BUSTINZA, 1961).

As glândulas uterinas da placenta de alpacas são descritas como de tipo tubulosas simples e sinuosas, mostrando grande variabilidade na morfologia de suas células. As células glandulares eram hipertrofiadas formando um epitélio cilíndrico alto, mas próximo à região do epitélio uterino, as glândulas apresentavam células mais baixas, de escasso citoplasma e luz reduzida. Outras células basais não atingiam a luz da glândula, e apresentavam figuras de mitose. Algumas células cilíndricas diferiram do resto por apresentar cílios bastante longos e grande número de mitocôndrias localizadas na região apical e polirribossomos e ribossomos livres espalhados por todo o citoplasma, sem vesículas de secreção. Em algumas poucas células o citoplasma apresentava pequenos grânulos que mostravam PAS +. Na luz observou células isoladas, sugerindo uma descamação celular nestas estruturas (OLIVERA, 2002).

Ultra-estruturalmente os núcleos das células glandulares da alpaca ocupava a região basal e eram circundados por um retículo endoplasmático granular bastante desenvolvido. Vesículas de secreção e o aparelho de Golgi grandemente

desenvolvido ocupavam a região supranuclear, este material secretado mostrava-se como um aglomerado de vesículas de diferentes dimensões, e conteúdo de baixa eletrodensidade rodeado por um halo esbranquiçado. As mitocôndrias situavam-se principalmente na região basal e apical da célula. Aos 264 dias de prenhez se observou o pregueamento da membrana basal de muitas células secretoras e próximas a estas a grande quantidade de mitocôndrias. Entre os 283 e 296 dias de prenhez as glândulas uterinas foram encontradas principalmente na região profunda do endométrio, a qual esta reduzida a uma estreita faixa nesta fase de prenhez, enquanto aos 347 dias, os grânulos citoplasmáticos com material granular eletrodenso eram menos numerosos do que os observados nas etapas anteriores. Este autor observou poucas alterações no padrão morfológico das estruturas glandulares durante as diversas fases de prenhez em alpacas (OLIVERA, 2002).

2.9 INTERFACE MATERNO-FETAL

Na placenta das espécies do gênero *Tayassu*, observaram-se grandes similaridades na histologia da interface materno-fetal. Ambas as espécies mostraram pregamento dos vilos coriônicos, os quais estiveram compostos de células trofoblásticas fetais com uma próxima interdigitação com as células epiteliais do útero materno. Nos primeiros estágios da gestação, a placenta do cateto (*Tayassu tajacu*) o pregamento foi mais superficial do que estágios posteriores. No caso do queixada (*Tayassu pecari*), estes pregamentos foram mais profundos e as pregas mais desenvolvidas nos seus extremos, no período quase de termo, a comparação da espécie anterior. Em ambas as espécies, o epitélio uterino materno foi cuboidal, entretanto delgado e liso nos lados e bases das pregas em vizinhança com as

pregas do trofoblasto (JONES et al., 2004; SANTOS, 2002).

A placenta de suínos assemelha muito à do gênero *Tayassu* em que é epiteliocorial e pregada, mas as pregas tendem a ser mais superficiais. Aos 109 dias, o epitélio uterino materno foi estreito e endentado por capilares maternos. As células do trofoblasto apresentaram-se evidentemente menos polarizado do que em outras espécies, entanto que os capilares fetais desenvolveram-se abaixo e entre as células adjacentes para aproveitar a vascularização materna (JONES et al., 2004).

Num estudo comparativo entre o camelo (*Camelus dromedarius*) e alpaca (*Lama pacos*), ambas as espécies apresentaram placentação de tipo epiteliocorial, com uma próxima interdigitação da superfície de microvilos do trofoblasto fetal junto com dos do epitélio uterino materno. Ao começo da gestação, esta interação cria uma leve ondulação da interface, mas nos estágios progressivos o aspecto muda tanto que o trofoblasto produz verdadeiras excrescências placentárias e o epitélio uterino forma criptas. No camelo, no entanto, estes permanecem relativamente simples até o término, mas na alpaca as excrescências vilosas são mais complexas, achando na interface materno-fetal demonstrou a íntima associação entre os dois tecidos e a presença de filamentos citoplasmáticos, o qual indica a possível função contráctil dos microvilos. Em algumas áreas, vesículas ou dilatações do espaço intercelular foram achadas em associação com as áreas basais dos microvilos, especialmente no trofoblasto (JONES et al., 2002).

Em camelos, estudos mostraram que a membrana apical das células uterinas eram completamente aplanada em estágios iniciais, mas depois mais tarde aparecerem as microvilosidades completamente espalhadas e em contacto com o trofoblasto, característico da interface na placenta epitélio-corial nesta espécie (ABD-ELNAEIM et al., 1999; SKIDMORE; WOODING; ALLEN, 1996).

Afirma-se que em dromedários os vilos são compridos e rombos com uma delgada camada de epitélio uterino materno e compridos e irregulares células trofoblásticas endentadas com estas. Ocasionalmente estão presentes células gigantes. Ultraestruturalmente a distribuição dos grânulos citoplasmáticos dentro das células trofoblásticas servem para produzir um efeito mosaico e os capilares fetais estão presentes nas faces exteriores destas interdigitações. Aparatos de Golgi evidentes não se presenciaram em cada tecido epitelial (JONES et al., 2004).

Em placentas de alpacas a superfície de contacto entre a face materna e fetal foi descrita com presença de depressões na superfície uterina e projeções no cório, com secreção de aspecto homogêneo sobre ambas as superfícies. Ao microscópio de luz a interface materno-fetal se apresentou como uma linha intensamente corada e PAS +. Este material foi descrito como glicoproteínas de grande diversidade e cuja composição varia nas diferentes espécies e ainda nas diversos estágios de prenhez. (JONES et al., 1995; JONES et al., 1997; OLIVERA, 2002). Enquanto em placenta de suínos, se atribui a este material funções de adesão, controle e inibição do processo de invasividade do trofoblasto, assim como relacionadas à presença de moléculas de sinalização de hormônios, enzimas e fatores de crescimento (DANTZER, 1985).

Micro-estruturalmente esta interface estava formada por microvilosidades bastante desenvolvidas, de dimensões regulares, em cujo eixo central estão presentes feixes de microfilamentos. As microvilosidades maternas mostraram-se mais eletrodensas do que as fetais. Ao microscópio de luz, se observou que, entre os 264 e 296 dias de prenhez as projeções do corio se apresentavam com maior número de ramificações quanto maior o tempo de gestação (OLIVERA, 2002).

Estas ramificações tinham um eixo central rico em colágeno, e presença de

células trofoblásticas grandes e volumosas em contacto com as células do epitélio uterino. Ao microscópio eletrônico de varredura a superfície da placenta um aspecto ondulado pelas projeções coriônicas, as quais estavam mais desenvolvidas em relação aos 150 dias de prenhez. Aos 347 dias de prenhez estas projeções coriônicas tornaram-se mais longas, sinuosas e ramificadas, além menos espessas do que aquelas observadas em idades anteriores, e os espaços delimitados pelas projeções mais reduzidos ainda e ultra-estruturalmente perdida de contato físico entre as superfícies do trofoblasto e epitélio uterino. Tanto as microvilosidades da camada trofoblástica quanto as do epitélio uterino mostravam uma leve separação e entre elas havia presença de material filamentososo eletrodenso (OLIVERA, 2002).

Observações em placenta de alpacas determinaram que o epitélio coriônico apresenta vilos não ramificados os quais estão orientados e intimamente apostados a correspondentes ondulações do epitélio uterino, pelo qual a interface materna fetal consiste de uma interdigitação intrincada de microvilos fetais e maternos, razão pela qual também definem a esta placenta como epitélio corial e difusa. Em gestações mais avançadas, ambos, o epitélio uterino e coriônico estão profundamente endentados por capilares placentários, é assim que a distancia intercapilar mínima das áreas onde se produzem processos de difusão pode ser tão pequena como 02 micrones. Afirmam que o fato de que esta distancia seja menor do que as achadas em placentas epitélio-coriais de outras espécies de ungulados domésticos, pode ser uma das várias adaptações da prenhez a grandes alturas (STEVENS et al., 1980).

Em alpacas, observaram em placentas de 30 e 45 dias muitos grânulos de secreção no epitélio uterino, enquanto células gigantes multinucleadas aparecem interpostas entre as células trofoblásticas restantes, mostrando uma intensa atividade fosfatase alcalina, depósitos contendo ferro e grânulos PAS positivos

(OLIVERA et al., 2003a).

Em placentas de lhamas notaram-se ao microscópio eletrônico a presença de múltiplas pregas. Áreas de papilas são mais densas na curvatura maior em direção ao centro da crescente e formada placenta. Os extremos das placentas têm áreas de papilas claramente notórias e uma faixa de 2-3 cm de largura, estendendo-se por todo o comprimento da curvatura menor em justaposição com os grandes vasos do alantocório, o qual esta claramente desprovida de papilas (FOWLER; BRAVO, 1998).

2.10 ARÉOLAS

Ao estudar a placenta das duas espécies de pecaris, queixada (*Tayassu pecari*) e cateto (*Tayassu tajacu*), pode-se distinguir que tinham duas regiões distintas, uma interareolar, caracterizada pela presença de rugas primárias e secundárias que se desenvolvem sobre as pregas da mucosa uterina; e outra areolar, a qual se caracterizou porque o trofoblasto não se adere ao epitélio uterino formando cavidades donde desembocam as aberturas das glândulas uterinas. Nestas regiões areolares, o epitélio trofoblástico apresentou rugas mais elaboradas, enquanto o epitélio uterino permaneceu liso e suas células mostraram-se cilíndricas. O material observado nestas aréolas foi PAS + (SANTOS, 2002).

Na porca, a microscopia eletrônica de varredura mostrou dobras circulares primárias e secundárias, as quais estiveram permanentemente sobre a face materna, enquanto que geralmente não se apresentaram de forma permanente na face fetal. A placenta areolar e a placenta interareolar apresentaram formação de dobradiças microscópicas permanentes. Observação das faces separadas rendeu informação sobre o desenvolvimento da superfície durante a gestação e ajudou a revelar a

arquitetura regular do endométrio pela formação de arestas primárias com arestas secundárias para seus lados, subdividindo as depressões ou fossas do lado materno. Esta conformação do lado materno explica a transformação das arestas coriônicas regulares, do dia 63 de gestação, a protuberâncias bulbosas no dia 100 (DANTZER, 1984).

Também em suínos, estudaram-se as aréolas regulares, tributárias a uma glândula única, as quais estão ao redor com uma larga rede capilar subepitelial no lado materno. No lado fetal, a rede capilar segue às papilas as quais se introduzem no interior da cavidade areolar ou convergem para formar um anel na periferia areolar. Enquanto que as aréolas irregulares, em contraste, tiveram limites e eram caracterizadas por dois ou mais glândulas abertas. A rede de capilares maternos tinha uma densidade moderada e seguia as corrugações, visto que a rede capilar fetal é basicamente bi-dimensional com algumas saliências sinusoides. Por isso, se sugeriu que esta conformação poderia favorecer mecanismos de controle vascular no útero, placenta e feto, assim como que este sistema de vasos específico para as aréolas são importantes para a manutenção da transferência de substâncias na aréola, assim como a sua secreção, metabolismo e absorção, o qual segundo a literatura não é igual nos dois tipos de aréolas (DANTZER; LEISER, 1993).

A placenta da porca contém estruturas específicas tais como aréolas regulares e irregulares, vesículas e cistos. Em base a reações histoquímicas, é possível indicar que as aréolas irregulares, vesículas e cistos diferem das aréolas regulares. O mucus das aréolas regulares contém glicoproteínas PAS positivas e atividade fosfatase ácida. Os mucopolisacáridos ácidos foram observados também nas pequenas áreas trofobásticas com células vacuolizadas em placentas de gestação iniciais (18-20 dias posteriores ao acasalamento). Sobre a superfície das

células longos microvilos formaram grupos assemelhando estereocílios. O hialoplasma destas células foi extremadamente electrodense. As partes apicais destas células foram preenchidas com grânulos de muco e se observou exocitose de seu conteúdo para o interior da cavidade areolar. Em muitas células trofobásticas longos vacúolos heterogêneos estiveram presentes. Nas cavidades areolares foram achados alguns resíduos celulares e células descamadas inteiras. O epitélio uterino cobrindo o muco areolar consistia de células absorptivas colunares altas, com borda de escova presente em suas superfícies livres. O muco areolar difere das aréolas regulares em características ultraestruturais e funcionais. Todas as estruturas contendo ácido mucopolisacáridos podem ser designados de muco areolar, embora a possível função deste não esta definida ainda (BIELANSKA-OSUCHOWSKA; KUNSKA, 1995).

Ao microscópio eletrônico de varredura foram observadas, em todos os períodos analisados na interface materno-fetal em placentas de alpaca de 150 dias de gestação até o término, a intervalos regulares pequenas áreas mais compactas na camada trofoblástica e com acúmulo de material amorfo. Estas áreas apresentavam uma superfície ligeiramente convexa, ocupavam extensões consideráveis, onde o limite das células trofoblásticas e as impressões deixadas pelas células glandulares uterinas eram notórias, por analogia a estruturas semelhantes encontradas na placenta de suínos, este autor as denominou de aréolas. Sobre as aberturas glandulares, o cório formava típicas aréolas, nestas áreas o trofoblasto exibia reações positivas ao PAS e à fosfatase ácida (OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a). Não obstante, em outros estudos nesta mesma espécie não se acharam estas áreas areolares (BUSTINZA, 1961).

As aréolas na placenta do dromedário foram só brevemente mencionadas e

descritas em estudos iniciais (VAN LENNEP, 1961, 1963). Enquanto posteriormente estudaram-se o desenvolvimento inicial das aréolas na placenta do dromedário, revelando que estas são similares às da porca, onde só uma glândula uterina se abre no interior da cavidade areolar (ABD-ELNEIM et al., 2003).

Em placentas de suínos, a presença de uma só glândula uterina abrindo-se no interior da cavidade areolar foi observado previamente (LEISER; DANTZER, 1994). Isto se diferencia notoriamente das éguas, nas quais freqüentemente têm mais de uma glândula uterina abrindo-se a este nível (DANTZER; LEISER, 1992; GINTHER, 1992). Nos dromedários, a primeira formação areolar se produz aos 4,5 cm CVR (*Curved- Crown- Rump*), e aos 5 a 9 cm CVR de comprimento a superfície endometrial foi desigual e com inúmeras aberturas de glândulas uterinas, as quais correspondiam à aréola fetal mal detectáveis, enquanto as células areolares fetais tinham variada aparência e cobertos com microvilos compridos (ABD-ELNEIM et al., 2003).

Ao microscópio de luz, aos 4,5 cm CVR estas aréolas aparecem como pequenas arredondadas ou abóbadas áreas da membrana cório-alantoidea sobre a estreita abertura das glândulas uterinas. Escuras secreções das glândulas uterinas e materiais celulares degeneradas de derivação trofoblástico e uterino marcaram o início do desenvolvimento da cavidade areolar. A média do diâmetro areolar da zona de contacto feto-materno e altura foram de 160 e 80 μm respectivamente. Já aos 33 e 34 cm CVR a aréola começou a ser variável em forma com conspícuas cavidades areolares porque as dobras da membrana corioalantoidea não está arranjado firmemente como antes, deixando espaço para o histotrofo a partir dos produtos de secreção das glândulas uterinas e provável degeneração das células do epitélio uterino. Skidmore, Wooding e Allen (1996) afirmam que uma bem

formada junção entre os tecidos fetais e maternos é estabelecida nas regiões interareolares ao redor do dia 56. Embora, nas regiões areolares a ligação dos microvilos é interrompida e a transferência de substâncias entre a face materna e fetal toma lugar através da cavidade areolar como acontece na porca (DANTZER, 1984) e em dromedários (ABD-ELNAEIM et al., 1999).

Ao microscópio eletrônico de varredura, observaram-se em placentas de dromedários que a superfície do cório correspondente ao lado oposto da abertura da glândula, os esboços da aréola fetal não foram claramente detectáveis até os 8,5 cm CVR. Embora, no seu centro as células foram de aparência variável e cobertas com microvilosidades compridas. Aos 10-13 cm CVR, as aréolas maternas mostraram um aspecto rugoso desde o centro até a periferia da abertura. Enquanto aos 34 cm CVR a aréola materna aparece com forma arredondada com muitas aberturas estreitas de glândulas uterinas localizadas centralmente. Ao microscópio eletrônico de transmissão observaram-se que as células areolares maternas foram de forma colunares curtas e piramidais com um núcleo relativamente pequeno e de localização central. Eles estavam cobertos com muitos microvilosidades curtas e na superfície apical mostraram materiais os quais podiam estar sendo comprimidos fora do interior da cavidade areolar. A superfície apical destas células contêm usualmente microvilosidades compridas os quais penetram no material degenerativo no interior da cavidade areolar, assim como protuberâncias de diferentes tamanhos, os quais em parte parecem como ilhas arredondadas no interior da obscura e homogênea substância da cavidade do lúmen (ABD-ELNEIM et al., 2003).

2.11 CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS

As fosfatases são enzimas que são capazes de hidrolisar ésteres fosfatos orgânicos. Eles são classificados em base a seu nível ótimo de pH, aqueles que exibem maior atividade arredor de um pH 9,0 são denominados de fosfatase alcalinas, enquanto que aquelas que mostram atividade arredor de pH 5,0 são chamadas de fosfatase ácidas (BANCROFT; STEVENS, 1996).

Foi possível detectar na placenta da alpaca, uma atividade fosfatase alcalina sob uma forma de um depósito de finas granulações em todos os períodos da prenhez na interface materno-fetal e na região apical das células trofoblásticas localizadas nas aréolas. Atividade fosfatase ácida também foi detectada como um precipitado granuloso nos citoplasmas das células epiteliais e glandulares, assim como na secreção presente na luz das glândulas, nas aréolas, ápice das células trofoblásticas e no citoplasma dos macrófagos fetais sob a forma de finas granulações. Enquanto a Reação de azul de Prússia para ferro foi detectada nas células endoteliais dos capilares fetais, nos macrófagos localizados na região da aréola e em parte das células glandulares, sob a forma de pequenos grânulos espalhados por todo o citoplasma. As células glandulares também exibiram uma secreção positiva ao PAS. Células não gigantes mostraram grânulos positivos ao PAS e fosfatase alcalina (OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a).

Em pecaris, em toda a interface materno-fetal encontrou-se reação PAS positiva, evidenciando que nesta área havia presença de glicoproteínas neutras. A presença de glicoproteínas foi evidenciada em forma de vesículas no pólo basal em pequenos grânulos citoplasmáticos no pólo apical do trofoblasto e no pólo apical do epitélio uterino. As membranas basais destes epitélios também possuíram reações

PAS+, mas nestes casos em função da alta concentração das fibras colágenas do tipo III, as quais estavam associadas a um elevado teor de glicoproteínas e proteoglicanos, responsáveis pela positividade a reações PAS+ (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SANTOS, 2002).

Em placenta de búfalas, se detectou uma reação positiva de Perl's nos placentônios e glândulas endometriais, mas foi negativa na placenta. Entretanto que a reatividade à enzima fosfatase ácida foi positiva nos placentônios, principalmente no mesênquima e trofoblasto, assim como nas regiões intraplacentomais e glândulas uterinas, enquanto que se achou uma positividade PAS no vilo fetal, ao nível das secreções assim como na luz das glândulas endometriais (PEREIRA, 2004).

2.12 DETECÇÃO E TRANSPORTE DE FERRO PARA O FETO

O ferro é um elemento importante para o desenvolvimento normal do feto, e seu transporte desde a mãe pode ser feito por meio de transportadores e receptores como a transferrina, receptor de transferrina 1 e 2, lactoferrina e uteroferrina (PEREIRA, 2004).

Diversos trabalhos detectaram a presença de ferro nos tecidos placentário de várias espécies de mamíferos. Em humanos, o ferro é transferido de forma rápida e de forma uni-direcionalmente da mãe para o feto, e envolve a ligação do complexo transferrina-ferro materno na superfície da placenta e posterior transferência do ferro e liberação da transferrina novamente para a circulação materna. A transferrina foi detectada na superfície dos microvilos e superfície das invaginações pinocíticas (KING, 1976).

Na interface materno-fetal de placentas de búfalo, se observaram ocasionalmente hematomas no sétimo mês de prenhez, sendo, no entanto, muito mais freqüente nas etapas finais, aos 9-10 meses de prenhez. Nestas regiões, as células trofoblásticas binucleadas mostraram hemácias em seu interior, indicando eritrofagocitose, sugerindo transferência de ferro para o feto, acreditando-se que o feto utilize esse ferro extravasado da mãe para sua hematopoese. As características morfológicas em microscopia de luz forma semelhantes nas duas fases de prenhez estudadas, sendo que essas estruturas não apareceram nas placentas de 4-5 meses de prenhez. Por tanto, consideram-se os hematomas como fonte de ferro para o desenvolvimento embrionário, na medida em que as hemácias maternas são fagocitadas, digeridas pelo trofoblasto. É possível que em búfalos estas observações também correspondam à transferência de ferro para o feto nas fases finais da prenhez (PEREIRA et al., 2001, 2004).

A transferrina não é só um carreador passivo para a placenta, mas também é importante no controle do metabolismo do ferro. A conexão da molécula no sítio do receptor produz uma mudança na conformação da proteína a qual facilita a transferência de ferro. A absorção do ferro é menor que a esperada para a renovação da transferrina na superfície da célula, entretanto, algumas proteínas são liberadas com o ferro ainda anexado a ela, sugerindo que somente um átomo de ferro é removido das moléculas que carregam dois átomos (FLETCHER, 1968).

Nos suínos, o ferro é secretado como uteroferrina pelo epitélio materno ao nível das aréolas que estão em relacionamento com as glândulas uterinas, na placenta. Esta uteroferrina é uma glicoproteína de transporte de ferro púrpura com atividade de fosfatase ácida, induzida pela progesterona, provendo ferro para os fetos (BAZER et al., 1991; DANTZER; NIELSEN, 1984; RENEGAR; BAZER;

ROBERTS, 1982; ROBERTS; RAUB; BAZER, 1986).

A atividade secretora do endométrio é de grande importância na placentação de suínos e uma das maiores funções é prover ferro para o desenvolvimento do embrião e feto (PALLUDAM; WEGGER; MOUSTGAARD, 1970). O ferro é secretado como uteroferrina, constituindo 10-15% da secreção uterina (BUHL et al., 1979; ROBERTS; BAZER, 1980). O ferro é levado em partículas de ferritina acumuladas basalmente nas células não ciliadas das glândulas uterinas e é levado pela uteroferrina a partir do epitélio materno ao nível das aréolas que estão em relacionamento com as glândulas uterinas, na placenta. A uteroferrina é transportada pela aréola para dentro de capilares cório-alantóides e então para o feto pela veia umbilical. Dentro do feto a uteroferrina é encontrada no fígado provavelmente para suprir ferro para a hematopoese ou filtrada pelo rim e transportada na urina para o saco alantóide para servir como um reservatório de ferro temporário. A síntese de uteroferrina segue o modelo comum para a secreção de glicoproteínas, como o ferro é levado como ferritina, é visto também livre no citoplasma ou acumulado basalmente em lisossomas nas células das glândulas uterinas (BAZER et al., 1991; DANTZER; NIELSEN, 1984; RENEGAR; BAZER; ROBERTS, 1982; ROBERTS; RAUB; BAZER, 1986).

Macrófagos na vizinhança das glândulas caracteristicamente estão carregados com ferritina contendo grânulos altamente refrateis, assim como em nas áreas haemófagas da placenta dos carnívoros, ultra-estruturalmente estas foram observadas como inclusões eletrodensas. Isto faz pensar que sua função seja regular o fornecimento de ferro, quando a secreção de uteroferrina varia durante o ciclo e isto algumas vezes faz que seja liberado no interior do interstício onde é tomado pelos macrófagos, quando a atividade glandular decresce. Outra hipótese é

que os macrófagos podem servir como células carregadas de ferro entre o epitélio glandular e vascularização (DANTZER; NIELSEN, 1984); ou uma combinação destas duas funções (DANTZER, 2002).

Em suínos, por meio da espectroscopia de absorção de raios-X, se conseguiu determinar derivados da uteroferrina como o ferro- zinco- uteroferrina (FeZnUt) e seu complexo fosfato (FeZnUt.PO₄) (WANG et al., 1996).

O método da ferrocianida foi usado para estudar a nível microestrutural a transferência de ferro materno-fetal no epitélio coriônico das regiões hematófagas da placenta de ovelhas durante o primeiro trimestre de gestação. Esta reação foi detectada em estruturas lisosomais, confirmando que o ferro trivalente é liberado a partir da hemoglobina digerida. O ferro férrico foi também detectado na matriz citoplasmática epitelial, especialmente na vizinhança de estruturas eritrosomiais, entre a superfície lateral de células epiteliais vizinhas, ao longo do complexo de interdigitação das dobras e na membrana basal. Os resultados destes estudos indicam que depois que o ferro férrico é liberado da hemoglobina materna no seu estado iônico, e sua distribuição subcelular e, provavelmente, sua rota de transporte sejam similares à placenta do porco da Índia, a qual se caracteriza pela tomada rápida de ferro proveniente da transferrina que provee a face materna (MYAGKAYA et al., 1984). Imunoistoquímicamente a uteroferrina também tem sido identificada no complexo de Golgi e nos grânulos de secreção associados (RAUB; BAZER; ROBERTS, 1985).

Resultados de cultivo celular demonstraram que as células do epitélio glandular dos suínos são específicas na secreção de uteroferrina, em contraste com os tipos de células onipotentes que secretam prostaglandinas E₂ e F_{2_α}. (ZHANG; PARIA; DAVIS, 1991).

Num estudo onde isolaram células do epitélio glandular, epitélio do lume e do estroma uterino do endométrio de suínos de 12 dias de gestação, por meio de digestão enzimática diferencial e filtração, se achou que os três tipos células diferem com respeito à morfologia em cultivo e com respeito a sua expressão de antileucoproteinase (ALP) e uteroferrina (Uf). As células do epitélio glandular mostraram a maior expressão do gene da uteroferrina, enquanto que a expressão nas células do estroma foi menor mas de uma forma nítida. O análise de Western blot usando anti-soro Uf porcino, detectaram níveis significativos de secreção de Uf secretada só no epitélio glandular. A máxima expressão dos genes de ALP e Uf estava associada à prenhez no endométrio porcino. Secreção detectável de uteroferrina foi achada só no epitélio glandular. Bandas imunoreagentes de tamanhos moleculares de 38 e 35 kDa representaram imaturas e maduras formas glicosiladas de uteroferrina respectivamente. No fluido alantoideo, embora, só a forma madura (35 kDa) foi detectada também em células do epitélio glandular. A secreção preferencial de uteroferrina pelo epitélio glandular foi confirmada pelo nível de acumulação de mRNA, usando análises de hibridização. Células do epitélio glandular tinham altos níveis de expressão do gene da uteroferrina, e com menor expressão, mas definida, detectada nas células do estroma. Em contraste, a expressão do gene da uteroferrina em células do epitélio uterino foi observado em forma não consistente e foi muito menor do que no epitélio glandular. A expressão de uteroferrina em células do estroma não pode ser atribuída à contaminação por células glandulares, já que os análises de estas mesmas amostras demonstraram indetectável a expressão gênica de ALP em células do estroma, coerente com os outros resultados demonstrados. Cultivos primários de epitélio glandular de gestações iniciais do endométrio porcino a expressão ALP e Uf foram reagentes a

hormônios esteroideos, sustentando a atividade de transcrição dos genes promotores e reguladores de seqüência associados ao endométrio (REED et al., 1996).

O estudo do transporte de uteroferrina no endométrio de suínos, feito pelo método de ouro coloidal, constatou que essa proteína estava localizada exclusivamente nas células não-ciliadas do epitélio glandular, e onde a síntese pareceu seguir uma rota comum de glicoproteína secretora (retículo endoplásmico rugoso, Golgi, vacúolos condensados e grânulos secretores). Como ferro, ou como ferritina foi visto de quaisquer destas formas livre no citoplasma ou acumulado basalmente em lisosomas nas células das glândulas uterinas (DANTZER; NIELSEN, 1984; RAUB; BAZER; ROBERTS, 1985).

Em eqüinos, por meio de métodos imunoistoquímicos, se constatou que é o epitélio que media o transporte ativo transcelular de ferro do plasma usando a uteroferrina como proteína de ligação. Observou-se que vesículas de transporte, provavelmente endossômicas / lissossômicas, localizadas no ápice das células colunares altas das aréolas continham a uteroferrina. Enquanto que nas células epiteliais glandulares e no lume areolar a uteroferrina foi encontrada na área de Golgi. Na região dos microtilédones não se evidenciou marcação para esta proteína (WOODING et al., 2000).

Em alpacas, também se acharam células fetais endoteliais que continham armazenamento de grânulos de ferro no citoplasma, isto foi observado nas áreas onde o cório formava aréolas (OLIVERA et al., 2003a).

O ferro férrico pode ser evidenciado pelo método de Azul de Prússia de Perl's. Este método inclui o tratamento com uma solução de ferrocianida ácida que resultara no desmascaramento do ferro férrico na forma de hidróxido, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ por

ácido clorídrico diluído. O ferro férrico então reage com a solução de ferrocianídica de potássio para logo produzir um composto de cor azul e insolúvel, a ferrocianida férrica (azul de Prússia) (BANCROFT; STEVENS, 1996).

2.13 MEMBRANA EPIDERMAL (QUARTA MEMBRANA)

Uma marcante característica única das membranas fetais dos camelídeos é o desenvolvimento de uma membrana extra de origem epidérmico fetal. Esta membrana foi achada nos dromedários (MUSA, 1977); embora já tinha sido descrita em camelídeos sul-americanos com anterioridade (MERTK et al., 1988; PRYSTOWSKY, 1960). Esta é uma membrana esbranquiçada opaca de aproximadamente 2 mm de espessura, cobrindo a superfície do feto, cabeça, pescoço e membros perto ao final da gestação. Histologicamente é um conjunto de camadas formadas de células epiteliais esquamosas estratificadas, algumas com limites celulares não definidos e anucleadas. Está aderida nas junções músculo-cutâneas do neonato tais como lábios, ânus, vulva e prepúcio, também é achada nas junções da pele com os coxins, lados do nariz e umbigo. Em associação com o aquoso fluído amniótico, a membrana epidermal é escorregadiça, facilitando o parto do feto (FOWLER; BRAVO, 1998; FOWLER; OLANDER, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

A coleta de placentas de lhama (*Lama guanicoe glama*) realizou-se em criadouros do Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) com sede em Maranganí, Província de Canchis (Cusco-Peru) (Figura 1), pertencente à *Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos-UNMSM* (Lima-Perú); assim como também criadouros da *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Altiplano (UNA)*, com sede em Santa Rosa, Província de Melgar (Puno-Peru) (Figura 01).

3.1 MATERIAL

Os animais utilizados na coleta estiveram submetidos às mesmas condições de alimentação e manejo. Coletou-se placentas de 09 fêmeas adultas, prenhas, com tempo de gestação entre 212 e 267 dias e com fetos de 30 até 55 cm de comprimento. Sete destas procederam do Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). Os outros dois animais foram cedidos pela *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Altiplano (UNA)*.

3.1.1 Equipamentos

- Micrótomos automáticos Leica RM 2065
- Ultra micrótomos RMC modelo MTXL
- Ponto crítico: Balzers Union Modelo CPD 020
- Microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VP

- Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6100
- Microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010
- Microscópio de luz binocular Leica DMR
- Câmara digital para captura de fotografia microscópica de luz: Leica DC 300F, Programa: Leica Qwin V3
- Metalizador Emitech Modelo K550.

3.2 MÉTODO

Os procedimentos usados na coleta foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 777 / 2005).

3.2.1 Confirmação e determinação do tempo da prenhez

Efetuo-se a verificação da prenhez, dos animais utilizados, mediante palpação retal para detectar a presença do corpo lúteo ou presença do feto no útero. Tomou-se do registro e das fichas de cada animal os dados relativos a data de acasalamento e posterior rejeição à presença dos machos para cálculo do tempo de prenhez.

3.2.2 Coleta do material biológico

Anestesiou-se os animais, mediante injeção intravenosa de pentobarbital sódico (30mg por kg), para a seguir serem sacrificados por denervação cervical. O útero

contendo a placenta e o feto foram isolados, lavados em água corrente para posterior processamento. Mediu-se o comprimento do feto (desde a base do crânio até a base da cauda), bem como o diâmetro biparietal e tomou-se o peso e dados relativos ao sexo, quantidade de líquido placentário e presença de pêlo cobrindo o corpo.

Obtiveram-se amostras de regiões uterinas em associação com membranas fetais. Algumas regiões foram perfundidas com solução de paraformaldeído 4% e outras com solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com buffer fosfato 0,1 M. Recortou-se, após duas horas, o material perfundido em pedaços pequenos de aproximadamente 1 x 1 cm para fixação por imersão em cada uma das soluções, respectivamente.

3.2.3 Processamento do material para observação ao microscópio de luz

O material foi processado seguindo protocolos já estabelecidos para pesquisas sobre placenta de outras espécies. A análise do material foi realizada em microscópio de luz Leica DMR[®] e a documentação fotográfica com câmara digital para microscópica de luz: Leica DC 300F[®], Programa: Leica Qwin V3[®].

3.2.3.1 Inclusão em Paraplast[®]

As mostras fixadas em solução de paraformaldeído 4% foram reduzidas à blocos com aproximadamente 0,5 cm e lavadas em PBS, para à seguir serem submetidas a desidratação, em concentrações crescentes de etanol de 50° a 100° (durando uma hora cada banho), com posterior diafanização em xilol e inclusão em paraplast.

3.2.3.2 Inclusão em Histoiresina® (glicol metacrilato)

Outras amostras também foram incluídas em Histoiresin ® (Leica-Germany). Para isso foram reduzidas à blocos de 0,5 cm e submetidas a lavagens em PBS, por três vezes, seguidas de desidratação, em concentrações crescentes de etanol (de 50° até 100°) durando cada banho 20 minutos. O material foi, então, submetido à resina de infiltração, composto de glicol metacrilato e etanol 95° na proporção 1:1 *overnight*, para depois incluí-lo em resina pura e polimerização a temperatura ambiente (TA) por quatro horas, seguido de embebição com resina e solução endurecedora, usando-se moldes para depois ser colocados em estufa a 37° C, por 48 horas, e cortadas com navalha de vidro.

Efetuo-se cortes de aproximadamente 5 µm de espessura, usando-se micrótomo automático e coletados em lâminas histológicas. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina, Tricrômico de Masson e PAS para logo ser montadas com Permount.

3.2.4 Reações histoquímicas

A análise histoquímica da placenta de lhama envolveu os métodos de atividade do Ácido Periódico de Schiff (PAS), da enzima fosfatase ácida e de detecção de ferro pelo método da reação Azul de Prússia (Perl's). Também se realizou a detecção imunoistoquímica da uteroferrina.

3.2.4.1 Detecção da atividade do Ácido Periódico de Schiff (PAS)

As amostras processadas em paraplast foram seccionadas na espessura de 5 μm , desparafinizadas, hidratadas e colocadas em tampão acetato pH 5.0, contendo β glycerofosfato de sódio 1.4 mM e nitrato de chumbo 60 μM por 2 h, a 37 ° C, segundo o método de Gomori (BANCROFT; STEVENS, 1996). A este procedimento seguiram-se lavagens em água destilada e imersão em sulfeto de amônio 1% em água por 2 minutos. As amostras foram lavadas em água destilada e contracoradas em verde metil 2% ou em hematoxilina de Myer sendo à seguir lavadas em água corrente e montadas em entellan.

3.2.4.2 Detecção da enzima fosfatase ácida

Cortou-se as amostras incluídas em paraplast, com 5 μm de espessura, seguido de desparafinização, hidratação e incubados em meio contendo TBS 0,02 M com glicina 0,2% e BSA 0,1 % durante 2 horas. Para evidenciar a atividade da enzima utilizou-se o α naphthyl phosphate como substrato e o fast red diazonium salt (Fast Red-Naphtol ASMX), durante 8 minutos, lavados em TBS e água destilada e contracorados com hematoxilina de Mayer. Após secas as amostras foram montadas em glicerina e observadas sob microscopia de luz convencional.

3.2.4.3 Detecção de ferro pelo método da reação Azul de Prússia (Perl's)

Para detecção de ferro utilizou-se a técnica de Perl's (BANCROFT; STEVENS, 1996). Cortou-se as amostras incluídas em paraplast com 5 μm , seguidas de

desparafinização, hidratação e incubados em solução de ferrocianeto de potássio 2% e ácido clorídrico 2% em água destilada, durante 10 minutos. Contracorou-se com 0,5% de vermelho neutro por 1 minuto. Após lavagens em água destilada desidratou-se o material em concentrações crescentes de etanol de 70° a 100° por 10 minutos cada vez, para posterior montagem com resina entellan.

3.2.5 Detecção imunoistoquímica da uteroferrina

A detecção da proteína transportadora de ferro entre a mãe e o feto foi realizada pelo método da Streptavidina / Peroxidase. Efetuou-se a reação em lâminas silanizadas. Os cortes de 5µm de espessura foram desparafinizados em xilol e hidratados em água destilada. Na sequência procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena em solução de 20 ml de peróxido de hidrogênio e 80 ml de álcool metílico por 30 minutos. O desmascaramento do antígeno foi feito em tampão citrato e em forno microndas em potência máxima por 15 minutos. incubou-se o anticorpo primário diluído 1:1000 em câmara úmida *overnight* seguido do anticorpo secundário (Dako Cytomation LSAB +[®] diluído 1:400 por 30 minutos. Em seguida adicionou-se aos cortes o complexo Streptoavidina/Perroxidase por 30 minutos. A reação foi visualizada pela diaminobenzina e contracorada com hemotoxilina de Harrys. Finalmente, desidratou-se o material e montou-se com bálsamo de Canadá[®] (Synth). Os detalhes do protocolo estão incluídos na seção Apêndices.

3.2.6 Processamento do material para observação ultra-estrutural

As amostras de placenta foram processadas para microscopia eletrônica de

transmissão e varredura.

3.2.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% foram lavadas três vezes em PBS por 10 minutos em cada lavagem, e logo pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2%. Novamente foram lavadas com PBS e água destilada, para logo serem imersas em solução saturada de uranila em água destilada. A seguir submeteu-se o material a desidratação, em concentrações crescentes de etanol de 50°, 70°, 90° por 10 minutos e 100° quatro vezes por 10 minutos; lavagem em óxido de propileno rolando por 10 minutos e posteriormente colocados em uma mistura de óxido de propileno/aradite nas seguintes proporções e tempos: 9:1 (1 hora), 1:1 (over night), 1:9 (4 horas); imersão em resina pura, duas vezes por 4 horas cada vez. Inclui-se em resina Araldite pura, usando moldes, que foram mantidos em estufa a 60°C por 72 horas para polimerização da resina. Efetuo-se cortes semifinos de 1 µm de espessura, em ultra-micrótomo, corados-os a quente com Azul de Toluidina 0,25% para observação ao microscópio de luz, da localização de sítios uterinos adequados contendo as membranas placentárias.

Depois da localização de regiões para o estudo ultra-estrutural foram feitos cortes ultrafinos de cerca de 60 nm de espessura, prateados num ultramicrotomo automático. Estes foram colhidos em telas de cobre e submetidos a contraste com acetato de uranila 2% em água destilada, durante 5 minutos, e por citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos.

3.2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Submeteram-se os fragmentos selecionados a três lavagens numa solução PBS 0,1M por 10 minutos cada vez, para a seguir serem pós-fixados em tetróxido de ósmio, e imersão em solução de ácido tânico 2% durante 1 hora. Novamente procedeu-se lavagens com PBS 0,1M para serem desidratados em concentrações crescentes de etanol desde 50° a 100° por 10 minutos cada vez, e transferidos para secagem em ponto critico. Procedeu-se à colocação das amostras em suportes de metal (“stubs”) para metalização com ouro e posterior observação em microscópio eletrônico.

Fonte: <http://www.aboutcusco.com/cusco/spa/maps.asp>

Figura 1 - a) Mapa do Perú mostrando sua divisão política em Departamentos, b) Mapa do Departamento de Cusco, destacando a Província de Canchis, c) Mapa do Departamento de Puno, mostrando a Província de Melgar. Em ambas as Províncias foram coletadas amostras utilizadas nesta dissertação

Figura 2 - Rebanhos de lhamas (*Llama guanicoe glama*). Notar a variedade de cores do pêlo e a formação de grupos. As orelhas em formato de “banana” e comprimento da face, são algumas das características que as diferenciam de outros camelídeos sul-americanos

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados envolvem a análise macroscópica e microscópica da placenta e do útero dos espécimes utilizados, bem como algumas características macroscópicas dos fetos também foram consideradas.

4.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

As características macroscópicas do útero e das membranas placentárias de todos os espécimes usados no presente estudo apresentaram-se semelhantes entre si. O útero gravídico, em todos os casos foi o esquerdo e estava distendido, sendo evidente, externamente, a presença do feto com os membros, o pescoço e a cabeça em avançado processo de desenvolvimento. Externamente, o útero possuía um aspecto pregueado, com coloração opaca, edematoso e com congestão de vasos sanguíneos (Figura 3). Na superfície interna uma coloração avermelhada intensa era evidente. As paredes eram mais engrossadas do que no corno não grávido.

As membranas fetais estenderam-se ao corno não grávido, mas não chegaram a ocupá-lo completamente. O cório apresentava pequenas estruturas em alto relevo e espalhadas em toda a superfície encaixando-se na superfície interna do corno uterino. Durante a coleta, pela manipulação, desprendiam-se estas duas superfícies com relativa facilidade. A face interna da placenta mostrou relativa quantidade de vasos sanguíneos. Não se observaram estruturas semelhantes a placentônios, tampouco nenhum outro tipo de projeção que estivesse ajudando na sujeição entre o útero e o cório.

Internamente o cório apresentou-se de cor vermelha, forte indicando uma

congestão. O líquido total achado entre as membranas placentárias foi, em todos os casos, de uma cor amarela e de aspecto turvo e em quantidades diferentes, não sendo possível medir por separado os líquidos amniótico e alantóideo (Tabela 1). Todos os fetos apresentaram os membros desenvolvidos, assim como a cauda, pescoço, cabeça, olhos, orelhas, focinho, pálpebras e cílios palpebrais (Figura 3). Os coxins digitais estavam moderadamente desenvolvidos. Os fetos apresentaram diferenças no comprimento e porcentagem de cobertura de pêlo sobre o corpo. Seis fetos apresentaram pêlo cobrindo toda a superfície corporal, outro apresentou pêlo só no dorso, e dois exemplares não apresentaram o corpo recoberto por pelagem (Tabela 1).

Figura 3 - a) Útero grávido de 261 dias. Notar a presença do feto localizado no corno uterino esquerdo e a saliência das suas extremidades desenvolvidas. A superfície externa do útero apresenta abundantes vasos sanguíneos dando-lhe aspecto avermelhado; b) Esquema do feto mostrando a sua localização, e sua relação com as membranas placentárias no estágio final de prenhez.; c) Feto de 261 dias. Neste estágio é notória a presença de pêlo cobrindo toda a superfície corporal. Os coxins acham-se em desenvolvimento (régua = 20cm); d) Cortes transversais das membranas placentárias; sítio de deiscência do amniócório (D);cérvix (E); corpo do útero (F); corno uterino não grávido (G); cavidade amniótica (H); cavidade alantoica (I); amniócório (J); alantocório (K); amnioalantóide (L); feto coberto pela membrana epidermal (M). (Tomado de Fowler; Bravo, 1988)

Tabela 1 – Características fetais dos espécimes de lhamas (*Lama guanicoe glama*) utilizados, Peru, 2004

	T	C	P	S	Lp	Pp	Dp
Exemplares							
TM 001	267	55	...	M	...	100%	...
TM 002	228	43,5	2.256	F	430	30%	4,7
TM 003	261	51,5	3.465	F	700	100%	5,1
TM 004	241	40,6	2.789	F	400	100%	5,5
TM 005	...	39,0	1.672	M	390	100%	5,0
TM 006	212	30,6	1.283	F	780	0%	4,7
TM 007	230	42,6	2.022	F	1.500	0%	...
TM 008	...	54	...	M	...	100%	...
TM 009	...	49,5	...	M	...	100%	...

T = dias de gestação, **C** = comprimento fetal em cm, **P** = peso fetal em gramas, **S** = sexo (M = macho, F = fêmea), **Lp** = líquido placentário em cc, **Pf** = presença de pêlo no feto, **Dp** = diâmetro biparietal fetal em cm

4.2 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

Os resultados obtidos a partir das observações realizadas são agrupados segundo as diversas estruturas estudadas.

4.2.1 Cório

O cório exibiu projeções coriônicas com formato pregueado em direção ao endométrio (Figura 4), que ao corte transversal demonstraram ramificações em número de 4 ou 5. Geralmente o espaço entre estas projeções era reduzido e ocupado pelas projeções endometriais. As projeções coriônicas estavam revestidas pelo trofoblasto em toda sua extensão e as células trofoblásticas formavam uma camada em contato íntimo com o epitélio uterino. Ao microscópio eletrônico de varredura, observaram-se as projeções coriônicas desenvolvidas, existindo entre elas um espaço reduzido ocupado pelo endométrio e fibras colágenas no interior e centro das projeções (Figura 5). A camada trofoblástica apresentou células de morfologia variada, desde cúbicas, arredondadas, até triangulares, com a superfície basal mais aguda. O núcleo apresentou-se basófilo e as superfícies basais da camada trofoblástica conformaram uma superfície de margem irregular, achando-se nos espaços destas irregularidades células mesenquimais e vasos sanguíneos, principalmente capilares (Figura 6).

O trofoblasto estava composto principalmente por células uninucleadas, algumas binucleadas e muito mais escassamente ainda, células gigantes multinucleadas. Na maioria das células foi possível observar um núcleo de forma circular e os nucléolos, fortemente corados. As escassas células trofoblásticas

gigantes acharam-se localizadas nos extremos apicais das projeções coriônicas e apresentaram seu citoplasma notoriamente basófilos, contendo 5, 6 ou até mais núcleos, sendo facilmente distinguíveis do resto das células da camada trofoblástica. As vezes, foi possível observar no citoplasma destas células estruturas laminares de posição vertical localizados entre os núcleos. Em alguns casos estes núcleos eram mesmo maiores do que as outras células trofoblásticas (Figura 7).

No mesênquima foi possível observar fibroblastos em abundante quantidade, além de macrófagos e de vasos sanguíneos de diferentes diâmetros e em proximidade com a camada trofoblástica. Caracteristicamente, nas placentas analisadas, os capilares fetais introduziam-se entre as células do trofoblasto, diminuindo a distância em relação aos capilares maternos que se encontravam sob o epitélio uterino (Figura 8c).

Durante a separação das interfaces materno e fetal, em alguns espécimes, o trofoblasto foi danificado, o que resultou em imagens em que as pregas coriônicas exibiram claramente os vasos sanguíneos abaixo do trofoblasto. Esta disposição resultou em imagens representantes da complexa disposição em forma de rede, na qual estes capilares encontravam-se. Os vasos sanguíneos foram observados quase sempre repletos de eritrócitos, os quais tinham uma forma elíptica. O desenvolvimento destes vasos produziu uma pressão sobre as células trofoblásticas, fazendo que mudassem sua forma ou espessura. Esta conformação pôde ser visualizada em cortes transversais analisadas sob microscopia de luz, onde estes vasos foram observados como protuberâncias arredondadas na superfície do cório (Figura 8), quanto em análise de varredura de superfície em microscopia eletrônica em que esta rede capilar ficava evidente (Figura 9).

Figura 4 - Fotomicrografias da área do endométrio próximo às projeções coriônicas (pc). Observar glândulas uterinas em abundante quantidade (g) e vasos sanguíneos maternos (vm) desenvolvidos e preenchidos de eritrócitos (e). Histoiresina, HE, a) 50x (barra = 200 μ m), b) 200x (barra = 40 μ m). c) Vaso sanguíneo materno mostrando a camada muscular (cm) e endotélio espesso (en). Paraplast, HE, 400x (barra = 20 μ m)

Figura 5 - Eletromicrografia de varredura. Corte transversal, a) projeções coriônicas (pc) em contato com o endométrio uterino (seta), (F = face fetal, M = face materna), 48,57x (barra = 100µm), b) interface materno-fetal, observar o desenvolvimento das glândulas uterinas, preenchidas por secreção. Projeções coriônicas em contacto com o endométrio. 22,85x (barra = 200µm), c) Notar a proximidade entre as projeções coriônicas e o reduzido espaço existente entre elas. 91,42x (barra = 100µm), d) Detalhe de projeção coriônica denotando no eixo central a presença de maior concentração de fibras colágenas (seta). 108,57x (barra = 100µm)

Figura 6 - Fotomicrografias do trofoblasto e interface materno-fetal. Observar as células do trofoblasto (T) contendo núcleos grandes. Observar ainda o mesênquima (m) com vasos sanguíneos fetais (vf) muito próximos uns de outros. Mesênquima com abundantes fibroblastos (f). Notar a proximidade entre a face materna (M) e o trofoblasto. Vasos sanguíneos localizados junto ao epitélio uterino, e outros interpostos entre as faces materna e fetal. Tais vasos podem ainda estar localizados nos espaços que separam as projeções coriônicas (pc). Vaso sanguíneo materno (vm). Resina Spurr, Azul de Toluidina, a) 400x (barra = 10 μ m), Paraplast, HE, b) 400x (barra = 20 μ m), c) 1000x (barra = 10 μ m), d) 1000x (barra=10 μ m)

Figura 7 – Fotomicrografia. Células trofoblásticas. Observar em a) célula trofoblástica binucleada (cb), outra de maior tamanho (CB) se acha deslocado no mesênquima (m), b) Célula trofoblástica gigante (cg), citoplasma com basofilia marcada e vários núcleos, c) duas células trofoblásticas gigantes juntas mostrando no citoplasma uma basofilia notória e grande quantidade de núcleos. Reatividade PAS + nas membranas basal e laterais. É possível notar a presença de restos de membranas laterais (seta) entre ambas as células. Paraplast, a) HE 1.000x (barra = 10µm), b) PAS 40x (barra = 20 µm), c) PAS 40x (barra = 20µm)

Figura 8 - Fotomicrografias. Corte transversal. Observar as ramificações digitiformes das projeções coriônicas (setas). Notar ainda a grande quantidade de vasos sanguíneos fetais (vf) de grande diâmetro, preenchidos por eritrócitos localizados por todo o contorno do mesênquima (m). No mesênquima encontram-se ainda fibroblastos (f). A camada trofoblástica ficou danificada durante a separação da interface materna. Histoiresina, HE. a) 50x (barra = 200µm), b) 200x (barra = 40µm), c) 1.000x (barra = 10µm)

Figura 9 - Eletromicrografia de varredura. Projeções coriônicas com vasos sanguíneos sobre a sua superfície. Esta disposição apresenta formato de rede complexa. Observar o pregueamento e ramificações das projeções coriônicas, bem como o reduzido espaço existente entre elas. Barras - a) 300µm, b) 200µm, c) 100µm

Observou-se reatividade PAS positiva em forma de grânulos no citoplasma das células trofoblásticas mononucleadas, assim como na lâmina basal e entre as junções de células trofoblásticas vizinhas. Nas células multinucleadas gigantes também se evidenciaram estas características (Figura 7). Reatividade de mediana intensidade da enzima fosfatase ácida observou-se sob a forma de acúmulos irregulares de cor negra no trofoblasto de todos os espécimes estudados, especialmente naquelas em vizinhança com a face materna, tanto quanto no mesênquima, mas com menor notoriedade (Figura 10). As reações histoquímicas de Perl's foram positivas, de forma discreta, na camada trofoblástica, observando-se como pequenos grânulos de cor azul quase pretos.

Em toda a interface materno-fetal, próxima do limite do epitélio uterino e da camada trofoblástica, também se observou reatividade PAS positiva e reatividade à enzima fosfatase ácida com maior intensidade do que no trofoblasto (Figura 10).

Ao analisar o mesênquima fetal identificaram-se fibras colágenas orientadas como linhas para o interior das pregas coriônicas, e estas a sua vez dirigiam-se ao interior das ramificações (Figura 11).

Ultraestruturalmente no trofoblasto observou-se material eletrodense amorfo no interior dos núcleos e os nucléolos também mostraram eletrodensidade notória. No citoplasma acharam-se grânulos eletrodensos de diferentes tamanhos que se espalhavam no citoplasma, assim como mitocôndrias próximas do pólo apical. Vesículas de diversos tamanhos e de baixa eletrodensidade quase homogêneas também foram observadas. Observou-se a presença de microvilos na superfície apical, entretanto sem que se estivessem interdigitando entre as junções de membranas de células vizinhas, mas sim, observou-se desmossomas. Evidenciou-se proximidade dos capilares fetais com as células trofoblásticas, de tal maneira que as

membranas basais do trofoblasto e do endotélio capilar se tocavam (Figuras 12, 13, 14).

Os vasos sangüíneos fetais acharam-se próximos à camada trofoblástica. Pôde-se encontrar o núcleo da células endotelial deslocado a um lado da luz do vaso. O endotélio apresentou em sua superfície pequenas prolongações orientadas ao lume do vaso (Figuras 12, 13).

Observaram-se fibras colágenas dispersas em todo o mesênquima. No eixo central das projeções coriônicas acharam-se concentrações organizadas destas fibras, evidentes devido à quantidade em que se apresentaram e com disposição de grossos feixes (Figura 15).

Leucócitos de relativo tamanho foram observados, com núcleo eletrodenso e citoplasma com granulações eletrodensas. Observou-se, em alguns casos estes leucócitos estavam próximos aos capilares fetais dispersos no mesênquima (Figuras 12, 13).

Figura 10 - Fotomicrografia. Reações histoquímicas na interface materno fetal, a) Reatividade de mediana intensidade da enzima fosfatase ácida, observada sob a forma de acúmulos irregulares de cor negra no trofoblasto. 100x, (barra = 40 μ m), b) Reatividade PAS +, observada como uma linha cor lilás fortemente corada (seta), 100x (barra = 40 μ m), c) Também se evidencia reatividade PAS + no citoplasma das células trofoblásticas em forma de grânulos, assim como entre as junções de células trofoblásticas vizinhas, 400x, (barra = 20 μ m)

Figura 11 - Fotomicrografia. Corte transversal das projeções coriônicas para mostrar a presença das fibras colágenas na base do mesênquima (m) e no interior das projeções coriônicas (seta). As fibras colágenas dispõem-se formando feixes no eixo central das projeções coriônicas. Vaso sanguíneo fetal (vf), vaso sanguíneo materno (vm). Paraplast, Tricrômico de Masson a) 100x (barra = 100 μ m), b) 100x (barra = 20 μ m), Picrosirius c) 100x (barra = 100 μ m), d) 200x (barra = 40 μ m)

Figura 12 - Eletromicrografia de transmissão. a) Nótese a intimidade entre a membrana da célula trofoblástica (ct) e do endotélio do vaso fetal (vf) Eritrócito (e), leucócito (l). 6.000x. b) membrana lateral entre dos células do trofoblasto evidenciando a união entre estas através de desmossomos (d). Núcleo (n). 20,000x

Figura 13 - Eletromicrografia de transmissão. Trofoblasto (T) mostrando as microvilosidades na sua superfície apical (setas) e mesênquima (m) com vaso sangüíneo fetal (vf) com leucócito (l) e eritrócito (e) no seu interior. Mesênquima (m) com presença de fibras colágenas e fibroblastos (f). Observar as projeções do endotélio para o interior do lume. a) 1.500 x, b) 1.200x

Figura 14 - Eletromicrografia de transmissão. Trofoblasto (T) mostrando vesículas de diferentes tamanhos e eletrodensidades no citoplasma e núcleos de grande tamanho (n). Notar a proximidade entre vaso sanguíneo fetal (vf) e célula trofoblástica (ct). Microvilosidades (setas), mesênquima (m), fibroblastos (f). a) 1.000x, b) 5.000x

Figura 15 - Eletromicrografia. Fibras colágenas no mesênquima. Observar em a) reduzida quantidade destas fibras na periferia do interior das projeções coriônicas, em relação aos fibroblastos (f). 4.000x, b) a grande quantidade de fibras próximo das bases das projeções orionicas (seta). 10.000x, c) disposição das abundantes fibras colágenas no eixo central das projeções coriônicas. 30.000x

4.2.2 Alantóide

Observou-se o alantóide junto ao mesênquima do cório revestindo a face interna deste. O alantóide era formado por uma camada única de células colunares de diferentes alturas, de modo que em conjunto formavam uma superfície irregular. O citoplasma apresentou-se eosinofílico, enquanto o núcleo era basal e de forma ovóide, em alguns casos, observou-se o nucléolo fortemente corado. A superfície apical das células mostraram-se basófilo (Figura 16).

Ao microscópio eletrônico de varredura, visto pela face fetal, observou-se que o alantóide possuía superfície irregular com algumas áreas pregueadas. As células apresentaram diversos contornos irregulares sendo alguns poliédricos e sem definição nos limites entre as células. A superfície apical destas células apresentava pequenas projeções, semelhantes a microvilos, dando-lhes um aspecto felpudo.

Em toda a superfície distinguiu-se a presença de estruturas salientes de formas poligonais ou ovais, de menor tamanho e diâmetro do que as células alantóicas, as quais, sob maior aumento, apresentaram-se volumosas e com superfície composta de múltiplas pregas e de aspecto felpado. Outras estruturas similares às anteriores também foram achadas na superfície do alantóide, de formas poligonais e quase circulares, no entanto formando depressões e de diâmetro maior (Figura 17).

Figura 16 – a) Fotomicrografia do alantóide. Observar as células colunares, com núcleos basais e nucléolos fortemente basofílicos. Mesênquima com abundantes fibroblastos, b) Observar a linha de reborda basofílica na superfície apical das células (seta). Historesina, HE, a) 400x (barra = 10µm), b) 1000x (barra = 10µm), c) Eletromicrografia de varredura. Vista do alantóide denotando uma superfície irregular com algumas áreas pregueadas. Os limites celulares apresentam contornos desde poliédricos até irregulares. Ressaltam estruturas salientes de formatos poligonais e ovais (setas). Outras estruturas são quase circulares formando depressões de menor tamanho e diâmetro (setas grossas), barra = 100µm

Figura 17 - Eletromicrografia de varredura. a) Alantóide, b) estruturas em alto relevo com formatos poligonais e ovais. Ao maior aumento estas apresentam-se volumosas e compostas de múltiplas pregas, de aspecto felpudo. Barras = a) 30µm, b) 10µm; c) e d) estruturas similares às anteriores, no entanto formando depressões, de diâmetro maior. Ao maior aumento elas mantinham a mesma aparência, ou seja eram formadas por pregas, com superfícies semelhantes à felpas, barras = c) 10µm, d) 3µm

4.2.3 Útero

O epitélio uterino mostrou-se em continuo contacto com o trofoblasto com exceção das áreas de aréolas. As células apresentaram-se baixas e aplanadas formando um epitélio irregularmente cúbico com núcleos evidentes. Em alguns pontos o epitélio tornou-se adelgado lembrando um epitélio pavimentoso. O citoplasma apresentou-se eosinofílico, enquanto que os núcleos apresentaram-se basofílicos. O epitélio uterino foi mais delgado no ápice das projeções ou pregas endometriais, assim como nas áreas onde os vasos maternos encontravam-se subjacentemente.

A lâmina basal das células do epitélio uterino também apresentou reatividade positiva ao PAS, observado como uma linha de cor roxa. O citoplasma destas células também apresentou grânulos PAS positivo. Observou-se também uma reatividade de mediana intensidade à enzima fosfatase ácida sob a forma de grânulos de cor negro, nas áreas próximas à interface materno-fetal (Figura 10).

Notou-se a presença de abundantes vasos sanguíneos de diâmetro considerável ocupando espaços entre as células do epitélio uterino, assim como no endométrio e próximos da camada muscular circular (Figura 4).

Entre o miométrio e a base das projeções coriônicas puderam-se distinguir duas áreas com características diferentes. A primeira, contígua ao miométrio e limitada pelo ápice das projeções coriônicas, na qual estava caracterizada pela presença de glândulas uterinas e em menor quantidade vasos sanguíneos, além de um tecido conjuntivo com poucas células. A seguinte área, localizada próximo dos ápices e entre as projeções do cório, na qual observaram-se poucas glândulas uterinas e vasos sanguíneos, estando estes últimos em maior quantidade do que na

área anterior, além de serem mais desenvolvidos, localizando-se, alguns deles, continuamente às células epiteliais uterinas. O tecido conjuntivo desta área era tipicamente frouxo. Também observaram-se fibras colágenas no endométrio.

Distinguiram-se no miométrio as duas camadas musculares, longitudinal e circular, ambas apresentaram abundantes fibras colágenas entremeadas às fibras musculares. Ao microscópio eletrônico de varredura, observou-se o miométrio bem desenvolvido e espessado.

4.2.4 Aréolas

Não se encontrou em todas as placentas de lhamas estudadas, observando-se em forma escassa. Em áreas compreendidas entre as projeções coriônicas observou-se espaços separando as faces fetal e materna. Nestas áreas o trofoblasto formava pregas ramificadas revestidas de trofoblasto colunar. Este espaço estava preenchido de material amorfo, achando-se no seu interior resíduos celulares. Também evidenciou-se que este material era extremamente PAS positivo (Figura 18).

Figura 18 - Fotomicrografias. a) Aréola. Observar o tamanho das aréolas quando comparado com as projeções coriônicas. Secreção PAS positiva. b) Observar a presença de material PAS positivo e os restos celulares. Paraplast, PAS, a) 200x (barra = 100µm), b) 400x (barra = 50µm)

4.2.5 Glândulas uterinas

Observou-se a presença de abundantes glândulas uterinas no estroma endometrial, em maior quantidade e quase exclusivamente perto do epitélio uterino, no limite da interface materno-fetal. Ao microscópio de luz, observaram-se, como resultado dos diversos cortes histológicos, muitas formas e tamanhos dos contornos e comprimentos, denotando a sinuosidade das glândulas uterinas. Estas glândulas estavam constituídas por um epitélio simples colunar, com um núcleo arredondado de tamanho grande localizado aproximadamente no meio da altura da célula. O diâmetro da luz glandular variou tornando-se maior quanto mais próximo encontravam-se do epitélio uterino. Todas as glândulas apresentaram a luz dilatada, devido ao cúmulo excessivo de uma secreção eosinofílica, sendo notável também na luz glandular, a presença de vesículas claras, geralmente próximas dos ápices das células e de tamanho variável, desde muito pequenas até quase do tamanho dos núcleos celulares (Figura 19). Algumas células apresentaram figuras de mitose. O citoplasma das células, e em maior intensidade o núcleo, apresentaram uma basofilia marcada.

A secreção da luz das glândulas uterinas mostrou também uma notória reação PAS positiva, achou-se grânulos PAS positivos também no citoplasma das células glandulares. Observou-se a maior reatividade da enzima fosfatase ácida próxima da luz das glândulas uterinas, assim como do citoplasma das células glandulares, evidenciada pela presença abundante de corpúsculos de cor preto, cobrindo quase por inteiro as glândulas. A detecção da ferritina férrica foi evidente na reação de Perl's positiva, ao nível da luz assim como nas células glandulares, porém em menor intensidade do que a reatividade da fosfatase ácida. Esta positividade evidenciou-se

sob a forma de pequenas granulações de tamanho menor do que os núcleos celulares e de cor azul a quase preto (Figuras 20, 21). Detectou-se uteroferrina no lume glandular com marcada intensidade, denotada por uma cor marrom, assim como no citoplasma das células glandulares sob a forma de pequenos grânulos da mesma cor (Figura 21). Em algumas áreas da interface conseguiu-se também observar a reatividade positiva para uteroferrina, mas de maneira escassa.

Ao microscópio eletrônico de varredura evidencio-se o contorno sinuoso das glândulas uterinas, e sempre com a luz glandular praticamente cheia de conteúdo, além de espaços, representantes das vesículas de secreção. Estas glândulas acharam-se em quantidade, de maneira que deram ao endométrio o aspecto de estar lotado de protuberâncias (Figura 22).

Ao microscópio eletrônico de transmissão observaram-se as células glandulares de tipo colunares, sendo os limites entre elas de contornos irregulares. Entre as junções apicais das células evidenciou-se uma alta eletrodensidade. Os núcleos mostraram-se de diferentes dimensões e pleomórficos, com áreas eletrodensas de tamanho variável em seu interior. Em alguns casos, observou-se um núcleo grande e com um halo esbranquiçado ao redor; neste halo encontravam-se estruturas eletrodensas, em outros casos, observou-se núcleos contendo 2 ou 3 nucléolos.

Espalhados no citoplasma encontrou-se estruturas circulares de diferentes diâmetros e com alta eletrodensidade, assim como abundantes vesículas de secreção clara em posição supranuclear. Observou-se retículo endoplasmático rugoso, especialmente arredor do núcleo, assim como aparelho de Golgi.

Numerosas mitocôndrias também foram observadas em posição supranuclear e perto do ápice das células (Figura 23, 24).

No lume glandular observaram-se vesículas claras e outras de baixa eletrodensidade e de variadas dimensões, assim como corpúsculos irregulares de diferentes tamanhos e eletrodensidades, evidenciando-se como restos celulares. Na secreção detectou-se algumas estruturas circulares uniformes. Algumas células apresentaram na superfície apical microvilosidades, e em menor frequência cílios desenvolvidos, mas com escassas vesículas de secreção. Em ambos os casos o número de mitocôndrias foi maior do que em outras células, estando, principalmente localizadas no ápice. Ao maior aumento, encontrou-se a membrana basal pregueada. Estas pregas eram definidas e de alta eletrodensidade, achando-se neste local pequenas vesículas de baixa eletrodensidade (Figuras 23, 24).

Figura 19 - Fotomicrografias. a) Glândulas uterinas, em maior quantidade e desenvolvimento na proximidade das projeções coriônicas. Paraplast, HE, 50x, b) Observar o epitélio cilíndrico alto e os núcleos localizados na metade do comprimento celular. Vesículas claras na secreção do lume. c) Núcleos e citoplasma altamente basofílicos. Secreção na luz eosinofílica. Notar a presença de vesículas na luz das glândulas. Histoiresina, HE, b) 400x (barra = 10µm), c) 1000x (barra=10µm), d) Corte semifino, Resina Araldite, 400x

Figura 20 - Fotomicrografias. Reações histoquímicas nas glândulas uterinas. Intensa reatividade da enzima fosfatase ácida em forma de grumos, de coloração vermelho-escuro, no lume glandular, e cobrindo toda a glândula. Paraplast, a) 25x , b) 400x (barra = 20µm), c) Notória reatividade à PAS no lume glandular. Grânulos eosinofílicos espalhados pelo citoplasma. 400x (barra = 20µm)

Figura 21 - Fotomicrografias. Detecção da ferritina férrica pelo método de Azul de Perl's. Evidente reatividade ao nível da luz, e no citoplasma das células glandulares, sob a forma de pequenas granulações de tamanho menor do que os núcleos celulares, de coloração azul, quase preta. Paraplast, a) 40x (barra = 10 μ m), b) 100x (barra = 10 μ m), c) Detecção imunohistoquímica da utero ferrina com marcada intensidade no lume glandular denotada por uma cor marrom, assim como no citoplasma das células glandulares sob a forma de pequenos grânulos da mesma cor. Paraplast, 40x (barra = 20 μ m)

Figura 22 - Eletromicrografia de varredura. Glândulas uterinas (g). Observar a secreção ocupando quase a totalidade do lume glandular (seta). Notar os espaços que correspondem às vesículas. A trajetória sinuosa das glândulas está rodeado de tecido conectivo frouxo do endométrio e de fibras colágenas, a) 114,28x (barra = 10µm), b) 742,85x (barra = 10µm)

Figura 23 - Eletromicrografia de transmissão das glândulas uterinas. a) Epitélio cilíndrico (E) com núcleos (n) grande. Observar grânulos de diferentes eletrodensidades e tamanhos, no núcleo e no citoplasma. No lume glandular (L) também existe material em formato de grumos de alta eletrodensidade, e vesículas de nula eletrodensidade, 400x, b) em alguns casos foi possível observar os núcleos rodeados por um halo de nula eletrodensidade, bem como a presença de microvilosidades na superfície apical das células (seta). 6.000x, c) detalhe de vesícula eletrodensa de posição supranuclear e presença de corpo de Golgi (G), 1.500x

Figura 24 - Eletromicrografia de transmissão. a) Presença de microvilosidades (setas) na superfície apical da célula glandular, 10.000x; b) célula mostrando cílios de grande comprimento em direção ao lume glandular (L). Estas células apresentaram menor eletrodensidade do que as outras células trofoblásticas, 10.000x. c) membrana basal com pregas de alta eletrodensidade. Observar que entre elas acham-se vesículas pequenas de baixa eletrodensidade, 25.000x

4.2.6 Membrana epidermal (quarta membrana)

Achou-se a membrana epidermal cobrindo o corpo do feto em toda a superfície, macroscopicamente, apresentando coloração esbranquiçada e opaca, friável ao tacto. Microscopicamente, era formada por células alargadas, de forma irregular, sobrepostas entre si, formando um epitélio estratificado de 7 ou mais camadas. A camada mais externa apresentou células aplanadas. Algumas células apresentavam 2 ou 3 núcleos, em outras não se evidenciou a presença de núcleo. Em alguns núcleos observaram-se figuras de mitose (Figura 25).

Figura 25 - Fotomicrografia. Membrana epidermal. Observar o epitélio estratificado composto por 7 ou mais camadas de células alargadas. A camada mais externa (setas) apresenta células aplanadas. Algumas células apresentam 2 ou 3 núcleos (*), enquanto que nas outras não se evidenciam a presença de núcleos. Paraplast, HE, a) e b) 1000x (barra = 10µm)

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em nossas observações encontraram-se diversas similaridades e diferenças ao serem comparadas com estudos realizados em outras espécies, as quais são agrupadas segundo os itens analisados na forma que segue.

5.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

As características que apresentaram os úteros grávidos, tais como, distensão e abundância de vasos sanguíneos na superfície externa e interna, e o descarte da presença de estruturas semelhantes a placentônios tampouco nenhum outro tipo de projeção entre o útero e o cório, coincide com as observações feitas em alpacas (BUSTINZA, 1961; OLIVERA, 2002).

Com respeito ao desenvolvimento e pelagem, as características são similares às observadas em alpacas para os mesmos períodos de gestação de nosso estudo (FERNANDEZ-BACA; SUMAR; NOVOA; LEYVA, 1973; OLIVERA, 2002; SUMAR; LEYVA, 1979).

O desenvolvimento do útero grávido e o seu espessamento observado neste estudo podem indicar uma hipertrofia de suas paredes que se produz como uma reação materna para suportar a pressão produzida pelo feto em desenvolvimento. A presença de fetos, sempre achados no corno uterino esquerdo, concordam com estudos prévios feitos em alpacas e lhamas e as características daqueles. A localização dos fetos no corno esquerdo confirmam a hipótese de que a implantação dos embriões no corno esquerdo oferece maiores condições para seu desenvolvimento (SUMAR; LEYVA, 1979).

5.2 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

A análise e interpretação das similaridades e diferenças microscópicas encontradas entre nosso estudo e outros relacionados são apresentados segundo cada estrutura estudada.

5.2.1 Cório

As células trofoblásticas apresentaram morfologia variada, desde cúbicas até triangulares, mas sempre com a região mais ampla dirigida ao pólo apical, e principalmente uninucleadas e de tamanho uniforme, achando-se, com pouca frequência, células binucleadas e gigantes. Esta variação morfológica das células trofoblásticas também foi descrita em outras espécies de camelídeos, tais como em dromedários (ABD-ELNAEIM et al., 1999; GOROKHOVSKII et al., 1975; JONES et al., 2002; WOODING et al., 2003), assim como em alpacas (BUSTINZA, 1961; JONES et al., 2002; OLIVERA, 2002).

No respeitante às características histoquímicas, as células uninucleadas da camada trofoblástica tanto quanto as binucleadas, mostraram reatividade PAS positiva, em forma de grânulos espalhados por todo o citoplasma, isto coincide com o observado em dromedários e alpacas (JONES et al., 2002; OLIVERA, 2002; OLIVERA, 2004), mas em nossa pesquisa conseguimos observar também esta intensa reatividade na lâmina basal, tal como foi observado também em pecaris (SANTOS, 2002), assim como na vizinhança de algumas células trofoblásticas, porém com menor intensidade.

Foi possível também observar uma reatividade à enzima fosfatase ácida em

algumas células trofoblásticas, localizadas preferencialmente no ápice das projeções coriônicas. Em alpacas também se notou esta reatividade, mas só nas células trofoblásticas relacionadas às aréolas (OLIVERA, 2002; OLIVERA, 2004)

A reatividade ao PAS e à fosfatase ácida, demonstra que a células trofoblásticas tem uma participação ativa na recepção de produtos provenientes da face materna, assim como no metabolismo e catálise destes, processos que incluem a produção de enzimas para poder cumprir com estas funções. Não descartamos que se possam encontrar outras enzimas envolvidas, as quais poderiam ser detectadas com estudos posteriores. A maior reatividade destas provas em lhamas, comparadas com alpacas e dromedários, pode evidenciar uma atividade metabólica mais eficientes nestas células.

A presença das projeções coriônicas, assim como a intromissão de capilares entre as células de ambas as faces, foram similares aos resultados de estudos em outras espécies com placenta epitélio-corial tais como pecaris, suínos, dromedários e alpacas, (ABD-ELNAEIM et al., 1999; JONES et al., 2002; JONES et al., 2004; OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a; SANTOS, 2002; SKIDMORE; WOODING; ALLEN, 1996; STEVENS et al., 1980;), embora só as alpacas apresentassem ramificações das projeções coriônicas, como encontradas nas lhamas.

Segundo nossas observações, estas especializações de interface fazem-nos pensar que estas servem para aumentar a área de contacto entre o trofoblasto e o epitélio uterino, garantindo uma melhor passagem de substâncias importantes para a subsistência do feto, e ainda pela grande quantidade de vasos sanguíneos entremeados entre as células de ambas as interfaces interdigitadas através das microvilosidades. Isto pode demonstrar uma das adaptações da lhama para levar com sucesso a prenhez em grandes altitudes.

Uma marcada reação PAS positiva evidencio-se entre a camada trofoblástica e o epitélio uterino, assim como no citoplasma destas células em forma de grânulos.

Estes achados foram descritos também em outras espécies como pecaris (SANTOS, 2002), em camelídeos (JONES et al., 1995; JONES et al., 1997) e em suínos (DANTZER, 1985), sendo que neste último há indicação que este material têm atribuições também na adesão entre as interfaces assim como na sinalização de moléculas.

Nossos resultados evidenciam uma importante atividade na produção e passagem de substâncias entre ambas as faces, mas não podemos afirmar o papel destas glicoproteínas na adesão, nem na sinalização de substâncias entre a placenta e útero. Estudos bioquímicos e moleculares posteriores poderão elucidá-los.

Ultraestruturalmente não se observaram interdigitações nas uniões entre células trofoblásticas vizinhas, o qual discorda com as observações feitas em alpacas (OLIVERA, 2002). Esta característica pode indicar a não necessidade de garantir uma maior sujeição e comunicação entre células adjacentes especialmente junto às projeções coriônicas. Assim mesmo acreditamos que estudos posteriores têm que ser feitos para confirmar estas observações, levando-se em conta que estas podem não estar revelando todos os detalhes, devido ao estado de conservação do material do nosso estudo.

Encontraram-se mitocôndrias na região apical do citoplasma, à semelhança de camelos (ABD-ELNAEIM et al., 1999; JONES et al., 2002). Acredita-se que as vesículas eletrodensas achadas no citoplasma correspondam, muito provavelmente, a grânulos PAS positivos observados ao microscópio de luz (OLIVERA et al., 2003a).

Estas características, somadas à positividade do PAS, observada ao

microscópio de luz, demonstram uma alta funcionalidade das células trofoblásticas na recepção e processamento de proteínas e glicoproteínas. Mas mesmo assim surge a questão sobre a quantidade e qualidade de proteínas que podem ser produzidas no trofoblasto e quais outras são transferidas da mãe.

Observaram-se células trofoblásticas gigantes em menor frequência do que em outras espécies de camelídeos como em alpacas e menos ainda do que em dromedários (JONES et al., 2002; OLIVERA, 2004). Não foi detectada atividade de enzimas fosfatase ácida, mas sim conseguiu-se observar grânulos PAS positivos no citoplasma. Em alpacas evidenciou-se uma reatividade PAS positiva menor e negativa à fosfatase ácida (OLIVERA, 2004).

O citoplasma das células gigantes da camada trofoblástica apresentou uma basofilia marcada e nestas acharam-se núcleos em número de 4 a 6, sendo em alguns casos visíveis os nucléolos, também basófilos. As estruturas laminares observadas no citoplasma de algumas células gigantes assemelham-se a restos de membranas intercelulares, o qual concorda com a suposta origem destas células em dromedários, nos quais se afirma serem formadas por fusão de células mononucleadas contíguas (SKIDMORE; WOODING; ALLEN, 1996), ao contrário das outras propostas para explicar a origem destas células em camelos bactrianos, dromedários e alpacas (ABD-ELNAEIM et al., 1999; GOROKHOVSKII et al., 1975; OLIVERA, 2002).

Estas observações poderiam explicar porque a placenta de lhamas carece de maior número de células trofoblásticas gigantes, devido ao fato das células mononucleadas serem suficientemente ativas para cumprir com as necessidades nutricionais do feto, fato que é comprovado pela notória reatividade às provas histoquímicas observadas nestas últimas células. Evidenciamos que a origem das

células trofoblásticas gigantes, muito provavelmente, inclui processos de fusão de células mononucleadas, mas mesmo assim depois de sua formação não mantém as propriedades histoquímicas das células mononucleadas, fazendo-nos pensar que as células trofoblásticas gigantes logo, da sua formação, adquirem funções diferentes ou especializadas, embora, estudos posteriores tenham de ser feitos para elucidá-las com maior precisão.

No mesênquima foram achados fibroblastos em abundante quantidade e macrófagos. Fibras colágenas foram evidenciadas em maior quantidade na base e no eixo central das projeções coriônicas e suas ramificações, do mesmo modo que foi observado em alpacas (JONES et al., 2004; OLIVERA, 2002). Este fato indica que as fibras colágenas servem como um reforço no suporte das projeções coriônicas, agindo como suportes rígidos no interior destas.

Vasos sanguíneos foram achados em grande quantidade no mesênquima, especialmente no interior das projeções coriônicas, em alguns casos com maior diâmetro do que algumas células trofoblásticas. Alguns outros vasos sanguíneos tentaram introduzirem-se entre as células da camada trofoblástica, produzindo uma pressão sobre elas e uma conseqüente mudança na morfologia destas. Em nossas observações não foi possível comparar o desenvolvimento destes capilares com respeito aos diferentes estágios de prenhez, devido à similaridade de tempos de gestação dos espécimes estudados, mas era notória a quantidade de vasos sanguíneos de grande diâmetro e repletos de eritrócitos, indicando já a existência de uma complexa rede vascular subtrofoblástica. Ultraestruturalmente pode-se observar uma estreita proximidade entre a lâmina basal da célula trofoblástica e do endotélio dos vasos fetais.

Esta intromissão de vasos sanguíneos na face fetal já foi descrita também em dromedários e alpacas, nas quais se faziam mais evidentes em gestações avançadas (JONES et al., 2002; OLIVERA, 2002). Observamos também uma aproximação entre a lâmina basal do trofoblasto e do endotélio fetal, menor do que em outras espécies também com placenta epitélio-corial como eqüinos e suínos.

Isto denota uma evidente adaptação das lhamas frente à hipóxia do meio ambiente em que habitam, regiões de serra, acima dos 3500 metros sobre o nível do mar, demonstrando que mesmo assim, nestas condições, a placenta continua oferecendo condições favoráveis para o feto, aumentando sua vascularização e diminuindo a distância entre capilares e células trofoblásticas.

5.2.2 Alantóide

Observou-se o alantóide como uma única camada de células colunares, e ao microscópio eletrônico de varredura evidenciamos sua superfície microvilosa e pregueada, com margens celulares irregulares e sobre ela dois tipos de estruturas, constituídas por lâminas pregueadas e também com microvilos superficiais presentes.

Em outras espécies como nos suínos (TIEDEMANN, 1979) também é descrito o alantóide com similares características celulares. As estruturas que se destacam da superfície alantoidea, achadas no presente estudo, têm similaridade com os hipomanes descritos em eqüídeos (BAZER, 1999; DICKERSON et al., 1967; KING, 1967), para os quais afirmaram serem massas de resíduos celulares.

Segundo nossas observações asseveramos que as células alantóideas têm função secretora também em lhamas, denotada pela superfície vilosa. Assim, mesmo

acreditamos que as estruturas achadas em sua superfície revelam uma especialização funcional do alantóides, mas não podemos determinar com certeza a constituição destas estruturas que possam elucidar sua função específica. Estudos posteriores precisam ser realizados para poder explicá-los.

5.2.3 Útero

O epitélio uterino mostrou-se cúbico, com o endométrio orientado em direção às projeções coriônicas, com abundantes grânulos PAS positivos. Abundantes vasos sanguíneos e glândulas uterinas acharam-se no endométrio, especialmente entre as células epiteliais e subjacentes a estas. O espessamento da camada muscular e a presença de fibras colágenas entremeadas também foram evidentes.

Esta conformação também foi descrita em placentas de alpacas, com aproximadamente o mesmo tempo de gestação (OLIVERA, 2002), mas com uma diminuição progressiva da espessura da parede uterina na prenhez de mais idade. Este espessamento surge como resposta ao efeito de pressão que produz o desenvolvimento fetal sobre o útero, considerando que o crescimento do feto a partir do sétimo mês é exponencial, e que 70% do peso do filhote ao nascimento acontece neste último período de gestação (NOVOA; LEYVA, 1996).

É evidente que o acréscimo da vascularização na face materna responde à necessidade de facilitar a passagem de substâncias e nutrientes da mãe para o feto, especialmente neste estágio da prenhez, onde as demandas metabólicas e nutricionais do feto começam a ser maiores, evidenciado também pela abundância de substâncias protéicas localizadas no citoplasma. Levando-se em conta também que, a partir deste estágio, incrementa-se o ritmo de desenvolvimento fetal, é lógico

pensar que a parede uterina compensa a pressão exercida pelo corpo do feto hipertrofiando suas camadas musculares e acrescentando certa quantidade de fibras colágenas para oferecer um maior suporte e evitar uma distensão excessiva do útero.

5.2.4 Aréolas

A presença de aréolas na placenta de lhamas esteve caracterizada por espaços de grande tamanho preenchidos de material amorfo e com uma notória reatividade positiva ao PAS. O trofoblasto mostrou-se convexo, enquanto o epitélio uterino convexo. Estes se acharam em pouca quantidade.

Em outras espécies como o dromedário, suínos e alpaca também encontrou-se material amorfo nestes espaços (BIELANSKA-OSUCHOWSKA; KUNSKA, 1995; OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a). Em geral as características morfológicas e histoquímicas das aréolas em lhamas compartilham muitas semelhanças com as de pecaris, suínos e alpacas (DANTZER, 1984; OLIVERA, 2002; OLIVERA et al., 2003a; SANTOS, 2002). Embora, não tenha sido possível determinar, em nosso estudo, se estas aréolas poderiam encaixar-se estruturalmente dentro do tipo regular ou irregular como descritas em suínos (DANTZER; LEISER, 1993).

Também não foi possível evidenciar a desembocadura de glândulas uterinas no interior das aréolas, como foi descrito em pecaris, dromedários e alpacas (ABD-ELNAEIM et al., 2003; BIELANSKA-OSUCHOWSKA; KUNSKA, 1995; DANTZER; LEISER, 1993; OLIVERA, 2003a; SANTOS, 2002). Estes mesmos autores reportam que a formação de aréolas na placenta ocorre durante as primeiras semanas após acasalamento

Mesmo assim, não foi possível para nós realizar outras observações, devido ao fato que em muitos casos, a condição de conservação do material não era ideal, assim podemos afirmar que em lhamas a presença de aréolas permite ao trofoblasto a oportunidade de ter uma fonte maior de substâncias e poder recebê-las numa maior quantidade e em forma constante.

5.2.5 Glândulas uterinas

As glândulas uterinas observadas em grande quantidade, especialmente próximas das projeções coriônicas, estavam constituídas por um epitélio colunar simples e de forma sinuosa, assim como a luz preenchida de material de secreção e altamente eosinofílico. Em placentas de outros camelídeos como alpacas e dromedários, acharam-se as mesmas características morfológicas glandulares (BUSTINZA, 1961; OLIVERA, 2002; VAN LENNEP, 1963), assim como em pecaris (SANTOS, 2002).

Evidenciou-se uma notória reatividade positiva as provas histoquímicas de PAS e fosfatase ácida, nas células glandulares. Microestruturalmente acharam-se presentes o retículo endoplasmático rugoso, o aparelho de Golgi, vesículas de secreção e mitocôndrias em abundante quantidade, enquanto que ao nível da luz encontraram-se microvilosidades e cílios. A membrana basal se encontrava notoriamente pregueada. Em espécies de pecari chegou-se a observar também o conteúdo do lume glandular e citoplasma glandular com reatividade positiva ao PAS (SANTOS, 2002). Estas mesmas reatividades histoquímicas e microestruturas foram reportadas em alpacas (JONES et al., 2002; OLIVERA, 2002), embora a prova da fosfatase ácida fosse evidenciada com menor intensidade do que em nosso estudo.

Nos cílios pode-se distinguir a presença de microtúbulos perto da base, fato que não foi citado na literatura consultada.

A alta reatividade histoquímica denota uma atividade metabólica muito alta nestas glândulas, especialmente na produção de proteínas e no processamento de moléculas antes de ser transferidas ao feto. A presença de microvilosidades e cílios em nossas observações nos fazem crer que o fluxo das secreções é regulado e direcionado pelo movimento destas estruturas para que o conteúdo seja levado à desembocadura das glândulas, no qual os microtúbulos têm ativa participação na geração de maiores movimentos. Assim, também o pregueamento da membrana basal e as vesículas achadas ao redor destas indicam uma adaptação para manutenção de um número maior de células em reduzido espaço, mas sem prejudicar a atividade metabólica destas, revelando a importância extrema destas estruturas na produção e transporte de substâncias para a manutenção do feto.

A uteroferrina foi detectada no lume glandular, no citoplasma das células glandulares sob a forma de granulações e muito escassamente na interface materno-fetal. Estes achados coincidem amplamente com estudos realizados em placenta suínas (BAZER et al., 1991; DANTZER; NIELSEN, 1984; RAUB; BAZER; ROBERTS, 1985; RENEGAR; BAZER; ROBERTS, 1982; ROBERTS; RAUB; BAZER, 1986) e com os estudos que demonstraram que a secreção desta proteína é uma expressão gênica específica das células glandulares (REED et al., 1996).

Podemos afirmar que em lhamas a uteroferrina também pode ser caracterizada como uma glicoproteína de transporte com atividade fosfatase ácida, demonstrado pelo fato que o lume glandular foi positivo de forma intensa ao PAS e a detecção da enzima fosfatase ácida, por isso sustentamos resultados similares aos

encontrados em placentas suínas (BUHI et al., 1979; DANTZER; NIELSEN, 1984).

A quase nula reatividade da uteroferrina na interface, somada também à escassa detecção pelo método de Perl's, na interface e camada trofoblástica, nos faz pensar que o ferro passa a receptores nas células trofoblásticas sob outra forma diferente à ferritina e à ferrocianida férrica, sendo depois a molécula de uteroferrina devolvida à circulação materna, atuando principalmente como uma molécula transportadora. A determinação dos mecanismos de passagem e as formas moleculares pelas quais o ferro é transferido aos receptores fetais, merece a continuação dos estudos.

5.2.6 Membrana epidermal (quarta membrana)

As características da membrana epidermal, constituída por um epitélio esquamoso estratificado, coincidem com as descrições feitas em lhamas e também em outros camelídeos (FOWLER; BRAVO, 1998; FOWLER; OLANDER, 1990; MERTK et al, 1988; PRYSTOWSKY, 1960). Em nosso estudo não observamos a presença de fibras colágenas, nem reatividade positiva a PAS, atividade à fosfatase ácida, nem detecção de ferro, razão pela qual podemos descartar algum tipo de funcionalidade metabólica desta estrutura, acreditando mais numa função mecânica de proteção da superfície interna das membranas fetais, assim como para facilitar o parto devido ao fato de ser uma membrana escorregadiça e que cobre todo o corpo do animal.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. A placenta de lhamas é do tipo pregueada, epitélio-corial e difusa.
2. As células da camada trofoblástica e especialmente as das projeções coriônicas têm uma ativa participação da recepção e metabolismo de moléculas importantes para a nutrição e manutenção do feto.
3. A ramificação das projeções coriônicas e a presença de fibras colágenas no interior destas e do mesênquima, são mecanismos de adaptação que surgem para garantir um maior suporte da interface e por subsequência uma ótima passagem de substâncias.
4. A disposição e quantidade dos vasos sanguíneos entre ambas as faces, materna e fetal, corresponde também a uma adaptação de garantir a passagem de nutrientes e oxigênio, frente ao médio ambiente hipóxico característico das zonas de grande altitude onde habitam as lhamas.
5. A presença de material PAS positivo na interface materno-fetal revela uma ativa passagem de glicoproteínas entre ambas as faces, sendo discutíveis se este produto tem outras funções.
6. As aréolas constituem uma fonte de reserva de substâncias para o feto, assim como para permitir um aproveitamento contínuo destas por parte do trofoblasto.

7. As glândulas uterinas têm um papel funcional muito importante na secreção e transporte de moléculas para o feto, tais como uteroferrina, glicoproteínas e ferro. Assim mesmo se demonstra uma atividade enzimática fosfatase ácida muito alta.
8. A uteroferrina em lhamas é produzida e secretada pelo epitélio glandular atuando como uma proteína com função de transporte do ferro, tendo características glicoprotéicas e de atividade fosfatase ácida.
9. A presença de vilosidades e cílios no lume glandular, assim como os pregueamentos das membranas basais das células glandulares são modificações adaptadas para acrescentar a funcionalidade destas células.
10. A membrana epidermal na placenta tem uma função especificamente mecânica, possivelmente para ajudar a expulsão do feto no momento do parto, descartando-se alguma funcionalidade metabólica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNAEIM, M.; PFARRER, C.; SABER, A.; ABOU-ELMAGD, C. J.; JONES, P.; LEISER, R. Feto-maternal attachment and anchorage in the early diffuse epitheliochorial placenta of the camel (*Camelus dromedarius*): Light, transmission -, and scanning-electron microscopical study. **Cells Tissues Organs**, v. 164, n. 3, p. 141-154, 1999.
- ABD-ELNAEIM, M.; SABER, A.; HASSAN, A.; ABOU-ELMAGD, A.; KLISH, K.; JONES C. J. P.; LEISER, R. Development of the Areola in the Early Placenta of the One-humped Camel (*Camelus dromedarius*): A Light, Scanning and Transmission Electron Microscopical Study. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 32, n. 6, p. 326-334, 2003.
- AMOROSO, E. C. Placentation. In: PARKES, A. S. **Marshall's physiology of reproduction**. London: Longmans Green, 1952. p. 127-311.
- BANCROFT, J.; STEVENS, S. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996. p. 243-399.
- BAZER, F. W.; WORTHINGTON-WHITE, D.; FLISS, M. S.; GROSS, S. Uteroferrin: a progesterone-induced hematopoietic growth factor of uterine origin. **Experimental Hematology**, v. 19, n. 9, p. 910-915, 1991.
- BIELANSKA-OSUCHOWSKA, Z. Ultraestructure of muçus areolae in the pig placenta. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 33, n. 2, p. 103-110, 1995.
- BIELANSKA-OSUCHOWSKA, Z.; KUNSKA, A. A new approach to the areaolar structures in the pig placenta: histochemistry and development of mucous areolae. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 33, n. 2, p. 95-101, 1995.
- BUHI, W.; BAZER, F. W.; DUCSAY, C.; CHUN, P. W.; ROBERTS, R. M. Iron content, molecular weight and possible function of the progesterone-induced purple glycoprotein of the porcine uterus. **Federation Proceedings**, v. 38, p. 373, 1979.
- BUSTINZA, J. A. **Estudio macro y microscópico de la placenta en Lama pacos (alpaca)**. 1961. Tesis (Bachiller en Medicina Veterinaria) - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 1961.
- BUSTINZA, J. A.; GALLEGOS, M. L.; SANTOS M. A. Observaciones del parto en la alpaca. In: CONVENCION DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS, 1., 1970. Puno, Perú. **Anales...** p. 153.
- CALLE, R. **Producción y mejoramiento de la alpaca**. Lima, Perú: Fondo del Libro. Banco Agrario del Perú, 1982. 334 p.
- CONDORENA, N.; SUMAR, J.; FRANCO, E.; ALARCON, V. Largo de gestación en llamas (*Lama glama*). In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 11., 1988, Lima, Perú. **Memorias...** p. 62
- DANTZER, V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. **Anatomy and Embryology**, v. 172, n. 3, p. 281-293, 1985.

DANTZER, V. Endometrium of Epitheliochorial and Endotheliochorial Placentae. In: GLASSER, S.; APLIN, J.; GIUDICE, L.; TABIBZADEH, S. **The endometrium**. New York: Taylor & Francis, 2002. p. 352-368.

DANTZER, V. Scanning electron microscopy of exposed surfaces of the porcine placenta. **Acta Anatomica**, v. 118, n. 2, p. 96-106, 1984.

DANTZER, V.; LEISER, R. Areola-gland subunits in the epitheliochorial types of placentae from horse and pig. **Micron and Microscopica Acta**, v. 23, n. 1-2, p. 79-80, 1992.

DANTZER, V.; LEISER, R. Microvasculature of regular and irregular areolae of the areola-gland subunit of the porcine placenta: structural and functional aspects. **Anatomy and Embryology**, v. 188, n. 3, p. 257-267, 1993.

DANTZER, V.; NIELSEN, M. H. Intracellular pathways of native iron in the maternal part of the porcine placenta. **European Journal of Cell Biology**, v. 34, n. 1, p. 103-109, 1984.

DICKERSON, J. W.; SOUTHGATE, D. A.; KING, J. M. The origin and development of the hippomanes in the horse and zebra. II. The chemical composition of the fetal fluids and hippomanes. **Journal of Anatomy**, v. 101, n. 2, p. 285-293, 1967

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. What can comparative studies of placental structure tell us? - A review. **Placenta**, v. 18, n. 25, p. S3-S9, 2004. Supplement A.

FERNANDEZ-BACA, S.; HANSEL, R.; SAATMAN, R.; SUMAR, J.; NOVOA, C. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. **Biology of Reproduction**, v. 20, n. 3, p. 586-595, 1979.

FERNANDEZ-BACA, S.; SUMAR, J.; NOVOA, C.; LEYVA, V. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y localización del embrión en la alpaca. **Revista de Investigaciones Pecuarias**, v. 2, n. 2, p. 131-135, 1973.

FLETCHER, J.; HUEHNS, E. R. Function to transferrine. **Nature**, v. 218, n. 29, p. 1211-1214, 1968.

FOWLER, M. E.; BRAVO, W. Reproduction. In: FOWLER, M. E. **Medicine and surgery of South American camelids: lhama, alpaca, vicuña, guanaco**. 2. ed. Iowa State U.S.A.: University Press, 1998.

FOWLER, M. E.; OLANDER, H. J. Fetal membranes and ancillary structures of lhamas (*Lama glama*) **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 9, p. 1495-1500, 1990.

FRANCO, E.; GARCIA, W.; PEZO, D. **Manual de crianza de llamas**. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, 1998. p. 14. (Publicación Técnica; n. 33).

FRANCO, E.; PEZO, D.; GARCIA, W. **Gestión de centros de producción de reproductores de alpacas y llamas**. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, 1998. [p.65]. (Publicación Técnica; n. 37).

GIDLEWSKI, T.; CHEVILLE, N. F.; RHYAN, J. C.; MILLER, L. D.; GILSDORF, M. J. Experimental *Brucella abortus* induced abortion in a llama: pathologic effects. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 77-82, 2000.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**. Basic and applied aspects, USA: Equiservices, 1992. [p. 85].

GOROKHOVSKII, N. L.; SHMIDT, G. A.; SHAGAEVA, V. G.; BAPTIDANOVA IU, P. Giant cells in the placenta of the bactrian camel in the fetal period of development. **Arkhiv Anatomii, Gistologii i Embriologii**, v 69, n. 9, p. 41-46, 1975.

HOANG-NGOC MINH; DOUVIN, D.; SMADJA, A.; ORCEL, L. Fetal membrane morphology and circulation of the liquor amnii. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.10, n. 4, p. 213-223. 1980.

JONES, C.; DANTZER, V.; STODDART, R. Changes in glycon distribution within the porcine interhaemal barrier during gestation. **Cell and Tissue Research**, v. 279, n. 3, p. 551-564, 1995.

JONES, C.; DANTZER, V.; LEISER, R.; KREBS, C.; STODDART, R. Localization of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial and haemomonochorial placentation. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 1-2, p. 100-114, 1997.

JONES, C. J. P.; ABD-ELNAEIM, M.; BEVILACQUA, E.; OLIVERA, L. V.; LEISER, R. Comparison of uteroplacental glycosylation in the camel (*Camelus dromedarius*) and alpaca (*Lama pacos*). **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 115-126, 2002.

JONES, C. J. P.; SANTOS, T. C.; ABD-ELNAEIM, M.; DANTZER, V.; MIGLINO, M. Placental Glycosylation in Peccary Species and its Relation to that of Swine and Dromedary. **Placenta**, v. 25, n. 7, p. 649-657, 2004.

JONES, C. J. P.; WOODING, F. B. P.; ABD-ELNAEIM, M. M.; LEISER, R.; DANTZER, V.; STODDART, R. W. Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 2, p. 397-405, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Editora Guanabara. Rio de Janeiro-Brasil, 1990. p. 388.

KING, B. F. Localization of transferrin on the surface of the human placenta by electron microscopic immunocytochemistry. **Anatomical Record**, v. 186, n. 2, p. 151-160, 1976.

KING, J. M. The origin and development of the hippomanes in the horse and zebra. I. The location, morphology and histology of the hippomanes. **Journal of Anatomy**, v. 101, n. 2, p. 277-284, 1967.

LA PERLE, K. M.; SILVERIA, F.; ANDERSON, D. E.; BLOMME, E. A. Dalmeny disease in an alpaca (*Lama pacos*): sarcocystosis, eosinophilic myositis and abortion. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 3, p. 287-293, 1999.

LATSHAW, W. K. Veterinary development anatomy. In: DECKER, B. C. **A clinically oriented approach**. Toronto: Philadelphia, 1987. p. 55.

LEISER, R.; DANTZER, V. Initial vascularization in the pig placenta: II. Demonstration of gland and areola-gland subunits by histology and corrosion casts. **Anatomical Record**, v. 238, n. 3, p. 326 - 334, 1994.

LEISER, R.; DANTZER, V. Structural and functional aspects of porcine placental microvasculature. **Anatomy and Embryology**, v. 177, n. 5, p. 409-419, 1988.

MERKT, H.; BOER, M.; RATH, D.; SCHOON, H. A. The presence of an additional fetal membrane and its function in the newborn guanaco (*Lama guanicoe*). **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 437-446, 1988.

MUSA, B. E. A new epidermal membrane associated with the foetus of the camel (*Camel dromedarius*). Zentralbl. Veterinärmed. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 6, n. 4, p. 355-358, 1977.

MUSA, B. E.; ABU SINEINA, M. E. Studies on the allantoic fluids of the camel (*Camelus dromedarius*). **Acta Veterinaria Beograd**, v. 26, n. 3, p. 107-114, 1976.

MYAGKAYA, G. L.; SCHORNAGEL, K.; VAN VEEN, H.; EVERTS, V. Electron microscopic study of the localization of ferric iron in chorionic epithelium of the sheep placenta. **Placenta**, v. 5, n. 6, p. 551-558, 1984.

NODEN, D.; DE LA HUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos**. Mecanismos de desarrollo y malformaciones. Zaragoza: Acribia, 1990. p. 399.

NOVOA, C. Fisiología de la reproducción de la hembra. In: FERNÁNDEZ-BACA, S. **Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos**. Santiago, Chile: FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991. p. 93-103.

NOVOA, C.; LEYVA, V. **Reproducción en alpacas y llamas**. Lima, Perú: Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1996. p. 32. (Publicación Científica; n. 26).

OLIVERA, L. **Implantação embrionária em alpacas Huacaya (*Lama pacos*)**. 1988. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

OLIVERA, L. **Ontogênese da placenta de alpacas (*Lama pacos*): estudo morfológico e imunohistoquímico**. 2002. 114 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

OLIVERA, L.; ZAGO, D.; LEISER, R.; JONES, C.; BEVILACQUA, E. Placentation in the alpaca *Lama pacos*. **Anatomy and Embryology**, v. 207, n. 1, p. 45-62, 2003a.

OLIVERA, L. ; ZAGO, D. A.; JONES, C. J. P.; BEVILACQUA, E. Developmental changes at the materno-embryonic interface in early pregnancy of the alpaca, *Lamos pacos*. **Anatomy and Embryology**, v. 207, n. 4-5, p. 317-331, 2003b.

PALLUDAN, B.; WEGGER, I.; MOUSTGAARD, J. Placental transfer of iron. **Yearbook, The Royal Veterinary and Agricultural University**, p. 62-91, 1970.

PEREIRA, F. T. V. **Eritofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* - Simpsom, 1945)**. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, A. F. Aspectos morfológicos dos hematomas placentários da placenta do búfalo (*Bubalus bubalis bubalis* - Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 151-154, 2001.

POLLARD, J. C.; LITTLEJOHN, R. P.; MOORE, G. H. Seasonal and others factors affecting the sexual behavior of alpacas. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3/4, p. 349-356, 1995.

PRYSTOWSKY, H. The placenta in C.A. In: VILLEE, C. A. **The placent and fetal membranes**. Baltimore: Williams and Wilkns, 1960, p. 1-159.

RAMÍREZ, A.; FRANCO, E.; PEZO, D.; GARCIA, W. **Diagnóstico y control de enfermedades en camélidos sudamericanos**. Lima, Perú: Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1998. (Publicación Científica; n. 34).

RAUB, T. J.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Localization of the iron transport glycoprotein, uteroferrin, in the porcine endometrium and placenta by using immunocolloidal gold. **Anatomy and Embriology**, v. 171, n. 2, p. 253-258, 1985.

REED, K.; BADINGA, L.; DAVIS, D.; CHUNG, T.; SIMMEN, R. Porcine Endometrial Glandular Epithelial Cells In Vitro: Transcriptional Activities of the Pregnancy_Associated Genes Encoding Antileukoprotease and Uteroferrin. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 469-477, 1996.

RENEGAR, R. H.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Placental transport and distribution of uteroferrin in the fetal pig. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1247-1260, 1982.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The properties function and hormonal control of synthesis of uteroferrin, the purple protein of the pig uterus. In: BEATO, M. (Ed.). **Steroid induced uterine proteins**. North-Holland: Biomedical Press, 1980, p. 133-149.

ROBERTS, R. M.; RAUB, T. J.; BAZER, F. W. Role of uteroferrin in transplacental iron in the pig. **Federation Proceedings**, v. 45, n. 10, p. 2513-2518, 1986.

SANTOS, T. C. **A relação materno-fetal em Tayassuidae**: catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari* Link, 1795). 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SKIDMORE J. A.; WOODING F. B. P.; ALLEN, W. R. Implantation and early placentation in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). **Placenta**, v. 17, n. 4, p. 253-262, 1996.

STEVENS D. H.; BURTON G. J.; SUMAR, J.; NATHANIELLSZ, P. W. Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). **Placenta**, v. 1, n. 1, p. 121-132, 1980.

SUMAR, J. **Defectos congénitos y hereditarios en la alpaca**. Teratología. Cusco, Perú: Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1989. p. 82.

SUMAR, J. Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 83, p. 133-141, 1988.

SUMAR, J.; LEYVA, V. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la llama (*Lama glama*). In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS, 3., 1979, Río Negro, Argentina. **Anales...** p. 22-23.

SUMAR, J.; SMITH, G. W.; MAYHUA, E.; NATHAMIELSZ, P. W. Adrenocortical function in the fetal and newborn alpaca. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 59A, n. 1, p. 79-84, 1978.

TIEDEMANN, K. The allantoic and Amniotic Epithelia of the Pig: SEM and TEM Studies. **Anatomy and Embryology**, v. 156, n. 1, p. 53-72, 1979.

VAN LENNEP, E. W. The histology of the placenta of *Camelus dromedarius* during the first half of pregnancy. **Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica**, v. 4, p. 180-193, 1961.

VAN LENNEP, E. W. The histology of the placenta of the one- humped camel (*Camelus dromedaries*) during the second half of gestation. **Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica**, v. 5, p. 373-379, 1963.

WANG, X.; RANDALL, C. R.; TRUE, A. E.; QUE, L. X-ray absorption spectroscopic studies of the FeZn derivate of uteroferrine. **Biochemistry**, v. 35, n. 44, p. 13946-13954, 1996.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. Separates sites and mechanisms for placental transport of calcium, iron and glucose in the equine placenta. **Placenta**, v. 21, n. 7, p. 635-645, 2000.

WOODING, F. B. P.; OZTURK, M.; SKIDMORE, J. A.; ALLEN, W. R. Developmental changes in localization of steroid synthesis enzymes in camelid placenta. **Reproduction**, v. 126, n. 2, p. 239-247, 2003.

ZHANG, Z.; PARIA, B. C.; DAVIS, D. L. Pig endometrial cells in primary culture: morphology, secretion of prostaglandins and proteins, and effects of pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 7, p. 3005-3015, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A

PROTOCOLOS DE LABORATÓRIO

PROTOCOLO Nº 1 **INCLUSÃO DE MATERIAL EM PARAPLAST®**

1. Lavagem em PBS por 30 minutos.
2. Álcool 70° uma hora ou over night.
3. Álcool 80° uma hora.
4. Álcool 90° uma hora.
5. Álcool 100° duas vezes por uma hora.
6. Xilol duas vezes por uma hora cada vez.
7. Paraplast 1 por 1,5 horas.
8. Paraplast 2 por 1,5 horas.
9. Inclusão.

PROTOCOLO Nº 2 **INCLUSÃO EM HISTORESINA®**

1. Lavagens com PBS 0,1 M 3 vezes.
2. Álcool 50° por 10 minutos.
3. Álcool 70° duas vezes por 20 minutos.
4. Álcool 85° duas vezes por 20 minutos.
5. Álcool 100° três vezes por 20 minutos.
6. Infiltração em glicol metacrilato – etanol 95° proporção 1:1, over night.
7. Inclusão em resina pura e polimerização a temperatura ambiente por 4 horas.
8. Estufa a 36° C por 48 horas.

PROTOCOLO Nº 3 **COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA**

1. Xilol 1	5 min
2. Xilol 2	5 min
3. Álcool 100°	5 min
4. Álcool 90°	5 min
5. Álcool 70°	5 min
6. Água corrente	10 min
7. Hematoxilina	5 min
8. Água corrente	10 min
9. Eosina	5 min
10. Álcool 90°	5 min
11. Álcool 100°	5 min
12. Álcool 100°	5 min
13. Xilol 1	5 min
14. Xilol 2	5 min

Leitura:

Azul: Núcleo, bactérias e cálcio.

Rosa: Citoplasma

Vermelho: Hemácias e granulações eosinofílicas.

Azul claro: Mucoproteína.

PROTOCOLO Nº 4 **COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON**

1. Xilol I	5 minutos
2. Xilol II	5 minutos
3. Álcool 100°	5 minutos
4. Álcool 90°	5 minutos
5. Álcool 70°	5 minutos
6. Água destilada	5 minutos
7. Hematoxilina férrica	5 minutos
8. Água corrente	5 minutos
9. Solução A	10 minutos
10. Água destilada	5 minutos
11. Solução B	10 minutos
12. Solução C	10 minutos
13. Água destilada	5 minutos
14. Ácido acético 1%	2 minutos
15. Água destilada	5 minutos
16. Álcool 90°	5 minutos
17. Álcool 100°	5 minutos
18. Álcool 100°	5 minutos
19. Xilol I	5 minutos
20. Xilol II	5 minutos

Solução A:

Fucsina ácida	1 g.
Ácido acético	1 ml.
Água destilada	100 ml.

Solução B:

Ácido fosfomolibdico	1g
Água destilada	100 ml

Solução C:

Azul de anilina	2,5 g.
Água destilada	100 ml.
Ácido acético	2,5 ml.

Dissolver a azul de anilina na água e deixar ferver. Tirar do fogo e adicionar o ácido acético. Esfriar e filtrar.

Leitura:

Vermelho: citoplasma, queratina, fibras musculares, fibras intercelulares, fibrina.

Azul ou verde: fibras colágenas, muco, cartilagem e osso.

Azul ou azul escuro: núcleo

Preto: Núcleos e gametas.

Amarelo: Eritrócitos

PROTOCOLO Nº 5 **COLORAÇÃO DE PICROSSIRIUS**

1. Bateria 1:

Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Álcool 90°	5 minutos
Álcool 70°	5 minutos
Água destilada	15 minutos
2. Solução de Picrossírius 1 hora
3. Lavagem em água corrente 5 minutos
4. Hematoxilina de Harris 5- 6 minutos
5. Lavagem com água corrente 10 minutos
6. Bateria 2

Álcool 95°	3 minutos
Álcool 100°	3 minutos
Xilol montagem	3 minutos

Leitura:

Vermelho: Fibras colágenas.

PROTOCOLO Nº 6 **HISTOQUÍMICA P.A.S (Ácido Periódico de Schiff)**

1. Desparafanizar
2. Água destilada 5 minutos
3. Ácido periódico 5-10 minutos
4. Lavar com água destilada 2 ou 3 vezes
5. Reativo de Schiff 15-20 minutos
6. Lavar com água da torneira 10 minutos
7. Hematoxilina de Harris 1-5 minutos
8. Lavar com água destilada
9. Desidratar
10. Montar.

Leitura:

Vermelho: Glicogênio, mucina, ácido hialurônico, retículo, fibrina, membrana basal.

PROTOCOLO Nº 7 **ATIVIDADE DA FOSFATASE ACIDA**

1. Incubação a 37°C por 4 horas.

Solução de incubação:

0,05 M tampão fosfato pH 5,0 100ml

Sódio B glicerofosfato 320mg

Nitrato de chumbo 200mg

Preparação de tampão fosfato:

Ácido acético glacial 103ul

Acetato de Na 0,2624g

Diluir o acetato em 20ml de água destilada e completar até 100ml.

2. Lavar com água destilada.
3. Submergir em solução de sulfeto de amônio 1% por 2 minutos.
4. Lavar com água destilada.
5. Contracorar com vermelho neutro 4' - 5'.
6. Lavar com água destilada.
7. Montagem com glicerina.
8. Passar esmalte arrededor.

Leitura:

Negro: atividade

Verde ou vermelho: Núcleo

PROTOCOLO N° 8

REAÇÃO DE AZUL DE PERLS

1. Desparafinizar
2. Lavagem com água destilada
3. Deixar em reagente de Perls 25- 30 minutos

Reagente de Perls (preparar na hora de uso):

Ferrocianeto de Potássio 1g

Água destilada 25ml

Ácido clorídrico solução aquosa 13% 25ml

Vermelho neutro 1g em 100ml de água destilada

4. Lavagem com água destilada
5. Lavagem com água da torneira
6. Corar com vermelho neutro por 1- 2 minutos
7. Desidratar
8. Montagem

Leitura:

Azul: ferro férrico

Vermelho: núcleo

Vermelho claro: outras estruturas.

PROTOCOLO N° 9

TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA PARA A DETECÇÃO DA UTEROFERRINA PELO MÉTODO DA STREPTAVIDINA / PEROXIDASE

A reação será realizada em lâminas silanizadas, contendo os cortes de tecidos placentários de lhamas de 5µm de espessura.

Marcador: anticorpo anti-uteroferrina, o qual foi gentilmente cedido pelo Prof. Fuller W. Bazer, Ph.D., Regents Fellow and O.D. Butler Chair in Animal Science, Texas A&M University, e a sua vez cedido pela Dra. Flávia Verechia.

1. Desparafinização

- 15 min. no Xilol I,
- 10 min. no Xilol II,
- 5 min. no Xilol/Álcool (+ ou – 50%).

2. Hidratação

- 5 min. no Álcool Absoluto,
- 5 min. no Álcool 95 %,
- 5 min. no Álcool 70 %,
- 5 min. na água destilada.

3. Bloqueio de Peroxidase Endógena

- 20 ml de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em 80ml de Álcool Metílico (Metanol)
- Deixar por 30 min. protegido da luz.
- Lavar com PBS (3 vezes por 5 minutos).

Obs: No caso de H_2O_2 10 vol pode ser usada pura ou na proporção de 30% de H_2O_2 e 70% de Metanol, deve ser misturada na hora, pois o Peróxido de Hidrogênio sofre decaimento de atividade quando exposto à luz.

4. Tampão Citrato (na panela de pressão)

- Após alcançar pressão deixar por 10 min., deixar esfriar (30 min.).

Preparação do Tampão Citrato:

- 160 ml de Citrato de Sódio (0,1 molar),
- 40 ml de Ácido Cítrico (0,1 molar),
- Completar para 2 litros de H_2O destilada, pH = 6,0.

5. Desmascaramento de antígeno (em micro ondas)

- Tampão Citrato, 15 min. em potência máxima (100).
- Deixar esfriar (30 min.).

6. Incubar com o anticorpo primário (não colocar no controle negativo)

- Uteroferrina
- Diluição 1:1000 e 1:1500, 80 µl / corte, em câmara úmida, 37° C *overnight*.
- Lavar em PBS (3 vezes).

Diluyente do anticorpo

- 0,5 ml de azida sódica à 5%,

- 0,25 ml de albumina à 5%,
- 12 ml de PBS.

7. Incubar com o anticorpo secundário KIT Dako Cytomation LSAB+ System-HRP U.S.A.®

- 1 Incubar com anticorpo secundário: StreptAB Complex/HRP duet mouse/rabbit (1:400).
- Incubar com Reagente C (Biotinylated Horse Anti-Mouse Immunoglobulin – 1:200), por 30 min em câmara úmida, temp. ambiente.
 - Lavar em PBS (3 vezes).
 - Deixar alguns minutos no PBS.
 - Incubar com Reagente A+B (A= Streptavidin; B= Biotinylated Horseradish Peroxidase, 5µl de cada, 1:400), por 30 min, temp. ambiente.
 - Repetir lavagem.

9. Revelação com DAB

- 2,5mg de DAB (diaminobenzidina),
- 5 ml de PBS
- Adicionar 7,5µl de H₂O₂ a 30%.
- Monitorar reação (tempo de revelação) no microscópio.
- Lavar em PBS e em H₂O destilada.

10. Contracoloração com Hematoxilina de Harrys ou Mayer

- 1 Deixar por 30 segundos
- Lavar em água corrente e destilada

11. Desidratação

- Álcool 70%,
- Álcool 95%,
- Álcool Absoluto.

12. Montar em balsamo do Canadá® (Synth).

Leitura

Observação da marcação denotada pela cor amarela e fotomicrografias ao microscópio de luz.

PROTOCOLO Nº 10

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

1. Fixação do material em glutarealdeído 2,5% tamponado.
2. 3 lavagens com PBS 0,1 M de 10 minutos cada uma.
3. Pós fixação com tetraóxido de ósmio 2% (em escuro) por 2 horas.
4. 3 lavagens com PBS 0,1 M de 10 minutos cada uma.
5. 2 lavagens com água destilada.
6. Solução saturada de uranila em água por 1 hora (em escuro).
7. 3 lavagens com água destilada de 10 minutos cada uma.
8. Álcool 50° por 10 minutos
9. Álcool 70° por 10 minutos
10. Álcool 90° por 10 minutos

11. Álcool 100° por 10 minutos, 4 vezes.
12. Óxido de propileno por 10 minutos.
13. Óxido de propileno : araldite (9:1) por 1 hora.
14. Óxido de propileno : araldite (1:1) over night
15. Óxido de propileno : araldite (1:9) por 2 horas.
16. Resina araldite por 4 horas duas vezes.
17. Inclusão em resina araldite.
18. Secagem em estufa a 60° por 72 horas.

PROTOCOLO Nº 11

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

1. Fixação do material em paraformaldeído 4 % tamponado.
2. 3 lavagens com PBS 0,1 M de 10 minutos cada uma.
3. Pós fixação com tetraóxido de ósmio 1% (em escuro) por 2 horas.
4. Ácido tânico 2% por 1 hora.
5. 3 lavagens com PBS de 10 minutos cada uma.
6. Álcool 50° por 10 minutos
7. Álcool 70° por 10 minutos
8. Álcool 90° por 10 minutos
9. Álcool 100° por 10 minutos 4 vezes.
10. Secagem em ponto crítico.
11. Colocação em suportes metálicos.
12. Metalização com ouro.