FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

ERITROFAGOCITOSE PLACENTÁRIA EM BÚFALAS

(*Bubalus bubalis bubalis* - Simpson, 1945)

SÃO PAULO

2004

FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

ERITROFAGOCITOSE PLACENTÁRIA EM BÚFALAS

(*Bubalus bubalis bubalis* - Simpson, 1945)

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

Departamento: Cirurgia

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria Angelica Miglino

SÃO PAULO

2004

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.1348
FMVZ

Pereira, Flávia Thomaz Verechia

Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* – Simpson, 1945) / Flávia Thomaz Verechia Pereira. – São Paulo : F. T. V. Pereira, 2004.
102 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Placenta. 2. Búfalo. 3. Trofoblasto. 4. Eritrofagocitose.
5. Áreas hemófagas. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Pereira, Flávia Thomaz Verechia

Título: Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945).

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais: Marília Mondin Thomaz Verechia e Nélcio Augusto Verechia e ao meu irmão César Thomaz Verechia pelo amor, carinho, apoio, companherismo e conselhos...”

“Ao querido Felipe Camargo Braga por estar sempre por perto me dando apoio e força...”

“Aos meus familiares por acompanharem e vibrarem com minhas conquistas...”

“A minha sempre Profa Maria Angelica Miglino por seu exemplo de força, determinação, sabedoria e por acreditar em mim, direcionando e apoiando-me para enfrentar cada desafio...”

AGRADECIMENTOS

- *A todos os docentes do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP pelos ensinamentos e amizade;*
- *Aos meus amigos: Assis, Adriana, Lilian, Robson, Caju, Daniele, Moacir e Raimundinha, Ana Rita, Zilah, Hildebrando, Selma, Patrícia Gonçalves, Marina, Marcelo, Vivian, Marta, Cadu, Mariana Matera, Mariana Braga, Tatiana, Ana Flávia, Celina, Ricardo, Emerson, Karina, Marco, Laura, Danila, Gustavo, Janaína, Wanderley, Bruno por passarmos juntos tantos momentos, que marcaram nossas vidas...;*
- *Aos colegas de Pós-graduação pela convivência...;*
- *À querida amiga Paula Coppi M. Ribeiro por sua amizade, constante ajuda e compreensão;*
- *À Jackeline, Maicon e Patrícia, da FMVZ-USP, por estarem sempre prontos a ajudar-nos;*
- *Aos funcionários dos Laboratórios de Anatomia, da FMVZ-USP, Edinaldo, Ronaldo e Diogo;*

- *Ao Sr. Gaspar, Edson e Sr. Gerson, do ICB-USP, pelo auxílio com a microscopia eletrônica de transmissão;*
- *Ao Prof. Dr. Idécio Sinhorini, da FMVZ-USP, por estar sempre disposto a ajudar-nos, com sua sabedoria, a interpretar nossas lâminas e fotografias científicas;*
- *Ao querido Prof. Dr. William C. Hamlett, Ph.D., da Indiana University School of Medicine, pela visão experiente em ressaltar pontos essenciais em nossa pesquisa;*
- *Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro, do IB-USP, por viabilizar o uso do microscópio eletrônico de transmissão;*
- *Ao Márcio e Waldir do IB-USP, da equipe do Prof. Dr. Alberto Ribeiro, pela ajuda na microscopia eletrônica de transmissão;*
- *Ao Prof. Dr. Francisco Javier H. Blazquez e Profa Dra. Maria Lúcia Z. Dagli, da FMVZ-USP, pelo auxílio sempre tão oportuno;*
- *Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr., Profa. Dra. Paula Papa, Prof. Dr. Antônio Augusto Coppi M. Ribeiro da FMVZ-USP e Prof. Dr.*

Joaquim Mansano da UNESP-Jaboticabal, pela competência e pelo privilégio do convívio;

➤ *A Profa Dra Agnemi Kohayagawa, da UNESP-Botucatu, pelas elucidações sobre o metabolismo do ferro;*

➤ *Aos funcionários da biblioteca, da FMVZ-USP, pelo auxílio nas pesquisas e pela correção das normas da Tese.*

RESUMO

PEREIRA, F. T. V. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945)**. [Placental erytrophagocytosis in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945)]. 2004. 102f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A função da eritrofagocitose observada após o extravasamento de sangue na interface materno-fetal é indefinida em várias espécies, incluindo o búfalo. Na ovelha, este processo foi muito estudado, e ocorre na zona arcada do placentônio (topos dos septos maternos e base dos vilos fetais), região onde o processo é realizado pelo trofoblasto. É possível que o ferro seja transferido para o feto mediante a eritrofagocitose trofoblástica nesta área hemófaga da placenta e nas glândulas endometriais. Para este estudo foram utilizadas placentas de búfalas entre 2-3, 4-5, 6-7, 8-9 e 10 meses de prenhez, fixadas por perfusão com solução aquosa de formaldeído a 10% e paraformaldeído a 4%, para microscopia de luz, e glutaraldeído a 2,5%, para microscopia eletrônica de transmissão, processadas e coradas para microscopia de luz (HE, azul de Toluidina, tricromo de Gomori, Hematoxilina-floxina, Azul de metileno - fucsina básica), histoquímica (reação de Perls, PAS e fosfatase ácida) além de microscopia eletrônica de transmissão. A metodologia utilizada permitiu-nos observar que as áreas hemófagas estavam presentes em determinadas regiões do placentônio, nas quais se identificavam áreas hemorrágicas entre o epitélio uterino e o trofoblástico, nas placentas de 4 a 10 meses de prenhez. Eritrócitos foram encontrados nas células trofoblásticas, elucidando, deste modo, a eritrofagocitose. A reação de PAS foi positiva, marcando substância mucóide, principalmente na base dos vilos fetais, células trofoblásticas binucleadas e nas glândulas endometriais da região interplacentomal. A reação de Perls foi negativa nos placentônios e positiva nas glândulas endometriais. A reação

de fosfatase ácida foi positiva tanto nos placentônios, quanto na região interplacentomal. A ultraestrutura da região das áreas hemófagas revelou eritrócitos ingeridos dentro das células trofoblásticas epiteliais em diferentes fases de digestão e eletrondensidades, várias vesículas endocíticas, cavéola, muitas gotículas lipídicas, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e a presença de grande quantidade de mitocôndrias. O epitélio das glândulas endometriais da região interplacentomal é do tipo colunar com a presença de microvilos em seu ápice, e núcleos basais.

Palavras-chave: Placenta. Búfalo. Trofoblasto. Eritrofagocitose. Áreas hemófagas.

ABSTRACT

PEREIRA, F. T. V. **Placental erythrophagocytosis in water buffalo (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945)**. [Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*-Simpson, 1945)]. 2004. 102f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The function of erythrophagocytosis observed after blood extravasation in the maternal-fetal interface is indefinite various species, including the water buffalo. In ewe, this process had been hardly studied and it occurs in the placentome arcade zone (top of maternal septa), region where the process is performed by the trophoblast. It is possible that iron is being transferred to the fetus through the trophoblastic erythrophagocytosis in the hemophagous areas of the placenta and in the endometrial glands. In our research we have been using placentomes of buffaloes between 2-3, 4-5, 6-7, 8-9 and 10 months of pregnancy, fixed by perfusion with 10% formaldehyde aqueous solution, 4% paraformoldehyde for light microscopy and 2,5% glutaraldehyde for transmission electron microscopy, processed and stained for light microscopy (HE, Toluidine blue, Gomori trichrome, hematoxilin - floxin, methilen blue – basic fucsin), histochemistry (Perls, PAS and acid phosphatase reaction) and transmission electron microscopy. The methodology used allowed us to observe that the haemophagous areas were present in determined regions of the placentome, in which there were showing haemorrhagic areas between the trophoblastic and uterine epithelium, in 4-10 months pregnant placentae. Erythrocytes had been found inside trophoblastic cells, thus contributing to explain the erythrophagocytosis. The PAS reaction was positive, staining mucoid substance, mainly in the basis of the fetal villi, trophoblastic binucleate cells and in an endometrial glands in the interplacentomal region. The Perls reaction was negative in the placenton as well as in the endometrial glands. The acid phosphatase reaction

was positive in placenta as well as in the interplacentomal region. The ultrastructure of the haemophagous areas revealed ingested erythrocytes inside the epithelial cells of trophoblast in different phases of digestion and electrondensities, various endocytic vesicles, caveolae, many lipid droplets, well-developed rough endoplasmic reticulum and large number of mitochondria. The endometrial glands epithelium of interplacentomal region is columnar type with microvilli and basal nuclei.

Key words: Placenta. Water buffalo. Trophoblast. Erythrophagocytosis. Haemophagous areas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - a) Esquema de um placentônio de búfalas, mostrando sua estrutura: parte fetal (cotilédone), parte materna (carúncula uterina) e a área hemófaga. O pedúnculo caruncular, endométrio, glândulas endometriais e o cório liso. b) Esquema em maior aumento da área hemófaga.....66
- Figura 2 – a) Fotomicrografia em menor aumento da morfologia do placentônio de búfalos aos 6,5 meses de prenhez, mostrando a base do viló fetal (Fe), topo dos vilos maternos (Ma), mesênquima (M), vasos fetais (vf). Histoiresina, azul de Toluidina, 50X. b) Detalhe da interface materno-fetal (10 meses de prenhez), que apresenta uma área de sangue extravasado (SE), células binucleadas (B) em provável migração pelo hematoma. Epitélio uterino (EU), vacúolos (v), trofoblasto (T), vasos fetais (vf) e mesênquima (M). Histoiresina, azul de Toluidina, 300X.....67
- Figura 3 – a) Esquema e b) fotomicrografia, detalhando a interface materno-fetal do placentônio de búfalos aos 10 meses de prenhez. Área de hematoma, mostrando hemácias (H), sendo fagocitadas pelo epitélio trofoblástico (setas). Notar a presença de células binucleadas (B) no trofoblasto (T) e no extravazamento de sangue. Epitélio uterino (EU). Paraplast, Tricromo de Gomori, 640X.....68
- Figura 4 – a) Fotomicrografia de placentônio de búfalo aos 4-5 meses de prenhez, onde se observa extravasamento de plasma (P) no interstício entre os epitélios uterino (EU) e trofoblástico (T), com a presença de hemácias (E). Em um outro viló fetal, observa-se a presença de secreção (S), confirmada em b). Mesênquima (M). Histoiresina, H&E, 50X. b) Observar a secreção PAS positiva no viló fetal (S). Trofoblasto (T), mesênquima (M). 6 meses de prenhez. Histoiresina, reação de PAS, 500X.....69
- Figura 5 – a) Interface materno-fetal, onde foram observados debris celulares (d) e prováveis células em apoptose (a) na área de sangue extravasado. Epitélio uterino (EU), trofoblasto (T), células binucleadas (B), hematoma (H) e mesênquima (M). 6-7 meses de prenhez. Histoiresina, H&E, 150X. b) Hematoma (H) que se apresenta concentrado na interface materno-fetal do placentônio de búfalo aos 10 meses de prenhez. Trofoblasto (T), epitélio uterino (EU), vasos fetais (vf), mesênquima (M). Histoiresina, azul de Toluidina, 650X.....70

Figura 6 – Fotomicrografias de luz de cortes semi-finos, demonstrando a área hemófaga (H), epitélio uterino (EU), hemácias fagocitadas pelo trofoblasto (setas), mesênquima (M), vesículas lipídicas (L). a) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 736X. b) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 1.200X. c) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 60X. d) 4-6 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 1.200X.....
.71

Figura 7 – Fotomicrografias de luz da reação de fosfatase ácida. a) Reatividade da enzima no placentônio de búfalas aos 8 meses de prenhez. 250X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. b) Reatividade da enzima na glândula endometrial. 448X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. As fotos menores inseridas em a) 125X e em b) 120X são os controles negativos.....
.72

Figura 8 – Fotomicrografias de luz da reação de Perls. a) Reatividade do ferro férrico (coloração azul) na glândula endometrial aos 4-6 meses de prenhez. 446X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. b) Controle positivo: fígado de camundongo. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro, 312X....
.73

Figura 9 – Eletromicrografia de transmissão mostrando a interface materno-fetal. a) Parte materna (M), parte fetal (F), células binucleadas (B) na parte fetal, que contém muitos grânulos de secreção (g) de diferentes eletrondensidades em seu citoplasma. Capilar (C). 7 meses de prenhez. Escala= 9,33µm. b) Interface materno-fetal mostrando partículas de diferentes eletrondensidades (e). Eritrócito digerido (ED). Escala= 9,58 µm. c) Detalhe de um capilar contínuo, presente nesta região de contato materno-fetal, com um polimorfonuclear (P) dentro dele. 7-8 meses de prenhez. Escala= 2,77 µm. d) Interface materno-fetal. Trofoblasto (T), hematoma (H), epitélio uterino (EU), capilar (C), polimorfonuclear (seta). Escala= 9,72 µm.....
.76

Figura 10 – a) Fotomicrografia em maior aumento, detalhando a interface materno-fetal do placentônio de búfalos aos 10 meses de prenhez. Área de hematoma, mostrando hemácias (H), sendo fagocitadas (E). Notar a presença de células binucleadas (B) no trofoblasto (T) e no extravasamento de sangue. Epitélio uterino (EU). Historesina, azul de Toluidina. 800X. b) Eletromicrografia de transmissão demonstrando uma grande área de extravasamento de sangue materno. Trofoblasto (T), hemácias (H), mesênquima (M). Escala= 6,48 µm.....
.77

- Figura 11 - Placenta de búfala aos 10 meses de prenhez. Eletromicrografias do sangue materno extravasado em detalhe. a) Células trofoblásticas (T), eritrócitos (H), pseudópode (seta), microfilamentos (m). Escala= 0,47 μ m. b) Detalhe do eritrócito (H) conectado a uma plaqueta (P) pelo glicocálix (seta). Microtúbulos (setas duplas interrompidas), grânulos eletrondensos (g). Escala= 0,5 μ m.....78
- Figura 12 - a) e b) Eletromicrografias mostrando detalhes do epitélio trofoblástico que está em contato com o sangue extravasado. Há a presença de cavéolas no trofoblástico (setas), que estão envolvidas na endocitose. 10 meses de prenhez. c) Outra região do epitélio trofoblástico (T) próximo a um eritrócito (E). Estrutura semelhante a um pseudópode (setas), glicocálix (g). 10 meses de prenhez. a) Escala= 0,10 μ m; b) Escala= 0,10 μ m; c) Escala= 0,26 μ m.....79
- Figura 13 - Eletromicrografia a) e esquema b) da placenta de búfalas aos 10 meses de gestação. Parte apical de células trofoblásticas, unidas por desmossomos (d), que está em contato com a área hemófaga (H), com uma grande quantidade de microvilos (M) e mitocôndrias (Mt). Dentro das células trofoblásticas há muitos eritrócitos, sendo digeridos (setas) e um corpúsculo residual (CR). Núcleo da célula trofoblástica (NT). Escala= 1,57 μ m.....80
- Figura 14 - Placenta de búfalas aos 10 meses de prenhez. Eletromicrografias do epitélio trofoblástico (T). a) Células epiteliais trofoblásticas com eritrócitos dentro delas sendo ingeridos na região supranuclear, em várias fases de digestão (E), mitocôndria (M), complexos de eritrolisossomos (seta fina). Fagossomos (seta cheia) com eritrócitos (E) são notados. Escala= 2,77 μ m. b) Detalhe de a): Eritrócitos, de diferentes eletrondensidades, estão sendo digeridos. Escala= 0,91 μ m.....81
- Figura 15 - Placenta de búfalas. Eletromicrografias da interface materno-fetal. a) Células trofoblásticas (T), eritrócito (E), vesículas endocíticas (seta). 7-8 meses de prenhez. Escala= 2,52 μ m. b) Mesma região de a), mas aos 7-8 meses de prenhez. Escala= 0,4 μ m.....82
- Figura 16 - Fotomicrografias de luz da região interplacentomal da placenta de búfalas aos 4-6 meses de prenhez. a) Endométrio (E), glândulas uterinas

(setas), vasos sangüíneos (estrela). b) Secreção PAS positiva (seta) na glândula endometrial aos 4-6 meses de prenhez. c) Endométrio (E), glândulas uterinas (setas), vasos sangüíneos (estrela) e miométrio (M). a) 50X; b) 800X e c) 52X.....84

Figura 17 – Esquema a) e eletromicrografia de transmissão b) mostrando as glândulas uterinas encontradas no endométrio (En). Epitélio colunar (E) com núcleo basal (N), microvilos na região apical (M) e vesículas na região supranuclear (v), lume da glândula (L), leucócito (seta), Golgi (G), mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático rugoso (E). 5-6 meses de prenhez. Escala= 5,83 μ m. Na foto menor, observa-se o detalhe da vesícula (v). 5-6 meses de prenhez. Escala= 0,40 μ m.....85

Figura 18 - Eletromicrografias de transmissão da glândula uterina. a) Detalhe dos complexos juncionais das glândulas uterinas (setas). Lume da glândula (L), microvilos (m). 5-6 meses de prenhez. Escala= 2,65 μ m. b) Nesta amostra de 10 meses de prenhez, notar a presença da maior quantidade de vesículas que na amostra de 5-6 meses de prenhez. Lume da glândula (L). Escala= 7,77 μ m.....86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVO.....	23
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1	Áreas hemófagas.....	26
3.2	Transporte placentário.....	41
3.3	Ferro.....	43
3.4	Glândulas uterinas.....	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1	Preparação das amostras para observação ao microscópio de luz.....	58
4.1.1	Processamento em Paraplast®.....	58
4.1.2	Processamento em Histoiresina®.....	59
4.2	Preparação das amostras para observação ao microscópio eletrônico de transmissão.....	59
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Caracterização morfológica da área hemófaga da placenta de búfalas.....	62
5.2	Observações nas diferentes fases da prenhez estudadas.....	63
5.3	Região Interplacentomal.....	83
6	DISCUSSÃO.....	87
7	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O búfalo tem sido associado ao homem desde os tempos pré-históricos. Originário da Ásia, este gênero animal ocupou inicialmente o Leste e Norte da África, e, cerca de 600 anos d.c.; foi introduzido na Europa pelas Cruzadas, durante a Idade Média. Ainda permanecem na Europa rebanhos remanescentes desta época, os quais são encontrados na Itália e Bulgária. Em épocas recentes, o búfalo tem prosperado nas América Central e do Sul.

O búfalo foi introduzido no Brasil (Pará) ao final do século passado (Ilha de Marajó). A maior parte do rebanho bufalino nacional, estimado em 3,0 milhões de cabeças em 1995, está localizado na região amazônica. Devido à sua natureza dócil, os búfalos podem ser usados como animais de tração, porém são também utilizados como fonte de carne de boa qualidade e de leite, utilizado principalmente na fabricação do queijo tipo mussarela.

Estes animais diferem dos bovinos, pois apresentam 48 (raça Carabao) ou 50 pares de cromossomos (raças Jafarabadi, Murrah e Mediterrâneo), enquanto que os bovinos possuem 60 pares de cromossomos (<http://ww2.netnitco.net/users/djligda/wbfacts.htm>).

Nosso trabalho concentrou-se em analisar alguns aspectos da placentação em búfalos a fim de se elucidarem algumas características peculiares da reprodução destes animais. A placenta de búfalos é classificada macroscopicamente como múltipla ou cotiledonária (PEREIRA et al., 2001) e, com relação às camadas que compõem a membrana inter-hemática, é classificada como sinepiteliocorial, devido à migração e fusão de células binucleadas trofoblásticas com células do epitélio uterino (CARVALHO, 2000).

De acordo com a classificação dos tipos placentários existentes nos animais, e à passagem de substâncias pela barreira inter-hemática, a transferência de ferro nas placentas córioalantóides pode ser realizada por 3 mecanismos: 1. Absorção de ferro ligado a transferrina através da superfície externa do trofoblasto em contato direto com o sangue materno circulante (placentas hemocoriais); 2. Absorção de eritrócitos maternos pelo epitélio coriônico em contato direto com acúmulos de sangue materno extravasado em áreas hemófagas (placentas endoteliocoriais e sinepiteliocoriais); 3. Absorção de ferro pelo epitélio coriônico em contato direto com secreções ricas em ferro provenientes das glândulas endometriais (placentas difusas).

Um outro mecanismo de absorção de ferro por extravasamento de sangue na interface materno-fetal, e a subsequente fagocitose dos eritrócitos pelas células trofoblásticas foi descrita em ovinos, bovinos, caprinos, carnívoros (caninos e felinos, mustelídeos) e quirópteras (WIMSATT et al., 1958; CREED; BIGGERS, 1964; SEAL; SINHA; DOE, 1972; GULAMHUSEIN; BECK, 1975; BURTON; SAMUEL; STEVEN, 1976; MYAGKAYA; VREELING-SINDELAROVA, 1976; MYAGKAYA; SCHELLENS, VREELING-SINDELAROVA, 1979; MYAGKAYA; SCHELLENS 1981, MYAGKAYA; DE BRUIJN, 1982; MYAGKAYA et al., 1984; KING; ENDERS; WIMSATT, 1978; KING, 1982; KREBS, et al., 1997; LEISER; ENDERS, 1980b; MURAI; YAMAUCHI, 1986; LATSHAW, 1987; DUMARTIN; CANIVENC, 1991; DUMARTIN; CANIVENC, 1992; ZELLER; KUHN, 1994; SANTOS et al., 1996; DANTZER, 1999) como hematomas placentários ou áreas hemófagas.

Sabe-se que as espécies suína e eqüina não possuem os hematomas placentários, e que no caso da espécie suína, os filhotes nascem com anemia ferropriva.

Vários estudos têm sido realizados, visando esclarecer este mecanismo da passagem de ferro para o feto, e os Autores têm demonstrado que a deficiência de ferro durante a gestação em humanos e animais, resultam em problemas a longo prazo no recém-nascido, como por exemplo aumento na pressão sangüínea, diminuição na função cerebral e comprometimento do desenvolvimento do sistema imune (McARDLE et al., 2003). Estes estudos podem contribuir ainda em pesquisas relacionadas ao câncer, pois o ferro é essencial para a proliferação de células cancerígenas (KICIC; CHUA; BAKER, 2001a; KICIC; CHUA; BAKER, 2001b; KICIC; CHUA; BAKER, 2002).

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o de caracterizar morfológicamente as áreas hemófagas, bem como a eritrofagocitose placentária em búfalas, mediante métodos histológicos e histoquímicos de microscopia de luz, e de microscopia eletrônica de transmissão, caracterizando a fase gestacional de ocorrência deste fenômeno, bem como correlacionar dados e idéias a respeito da placentação destes ruminantes, com as possíveis funções destes hematomas placentários.

3 *REVISÃO DA LITERATURA*

3 REVISÃO DA LITERATURA

As áreas hemófagas na placenta têm sido extensivamente estudadas por serem uma região modificada e possível suprimento de ferro e outros nutrientes para o feto.

3.1 Áreas hemófagas

Na placentação dos Artiodáctilos, pequenas áreas absorptivas e fagocíticas da membrana cório-alantóide (aréola, sistemas arcados, pregas marginais, etc) são a maior característica desta ordem, entretanto há alguns subgrupos nos quais não foram relatadas as formas mais comuns, que são a aréola oposta à abertura da glândula uterina e um sistema arcado entre as bases dos vilos e pregas marginais. Os placentomas da placenta cotiledonária possuem pregas marginais de cório-alantóide recoberto com citotrofoblasto fagocítico, que obviamente absorve as secreções das grandes glândulas endometriais, que se abrem ao redor da base dos pedúnculos carunculares. Na cabra e na ovelha estas glândulas se abrem nas regiões laterais, assim como na base das carúnculas. A maioria destas áreas absorptivas é provavelmente suprida com pelo menos alguns eritrócitos maternos extravasados (MOSSMAN, 1987).

Segundo SEAL; SINHA; DOE (1972) há várias rotas de transferência de ferro da mãe para o feto, como: secreções uterinas, transferência direta de ferro no soro através das membranas da placenta cório-alantóide e fagocitose das células sangüíneas vermelhas maternas extravasadas, pelo trofoblasto dentro de órgãos hemófagos, ou hematomas seguidos por liberação de ferro de hemoglobina materna

na circulação fetal. Em espécies com placentação não-hemocorial, a passagem de ferro parece ser por liberação de hemoglobina materna de células vermelhas extravasadas, como o encontrado em hematomas e áreas fagocíticas similares em membranas cório-alantóides.

Já na placentação de antílopes (*Rhynchotragus kirkii nyikae heller*), não há extravasamentos de sangue materno em nenhuma região dos cotilédones (WISLOCKI, 1941).

Nos estudos histológicos da placenta da ovelha, realizados por WIMSATT (1950), observou-se que na superfície, nos placentomas, ou seja, nas bases dos vilos coriônicos, grande quantidade de sangue materno era extravasado entre o cório e os segmentos apicais dos septos intercriptais. Isto resulta na formação do hematoma, ao contrário da situação que ocorre na maioria das espécies de ruminantes, que é uma característica do placentoma da ovelha. Os eritrócitos maternos são fagocitados pelas células trofoblásticas adjacentes, as quais eventualmente se acumulam em depósitos intracitoplasmáticos de pigmentos hematógenos não-ferruginosos. Supõe-se que este hematoma seja resultado da abertura dos capilares maternos no topo dos septos intervilosos do trofoblasto adjacente. A prova de tal atividade é alusiva, porque os capilares abertos não são certamente demonstráveis, e, além disso, as figuras histológicas sugerem que o extravasamento do sangue é esporádico e pode ser induzido, ao menos no final da prenhez, pela abertura direta dos vasos maternos, como descrito acima. As figuras histológicas descritas sugerem que: - a destruição dos tecidos maternos ocorre em maior velocidade na zona superficial do placentoma do que em zonas mais profundas, ou pode cessar para regeneração dos componentes das extremidades dos septos no final da prenhez, um fenômeno que ocorre profundamente no

placentoma; - o extravasamento do sangue materno ocorre em uma região onde as atividades histolíticas do trofoblasto são menos pronunciadas do que em zonas mais profundas onde o extravasamento de sangue não ocorre; - o sangue extravasa de capilares que possuem paredes mais espessas e estão mais afastados da superfície do endométrio quando comparado com os capilares mais profundos que não permitem o extravasamento, indícios que vão contra a existência de aberturas no final dos vasos ao longo do trofoblasto; - uma estática congestão pode ocorrer nos capilares terminais, resultando em colapsos necróticos das extremidades septais e liberação do sangue contido em capilares ingurgitados; - extravasamento pode ocorrer no tecido conjuntivo das extremidades septais e deste local para dentro do espaço livre que o rodeia.

De acordo com as descrições de LAWN; CHIKUOINE; AMOROSO (1969) e WIMSATT (1950) na placenta de ovelhas e cabras, a região especializada do placentônio onde ocorre o extravasamento de sangue materno e sua fagocitose, tem a função de suprir a necessidade de ferro para o feto.

ENRIQUEZ-YAP (1974) descreve o placentoma de búfalas Carabao como sendo uma estrutura em forma de cogumelo com uma superfície livre convexa e um pequeno pedúnculo. A membrana ou barreira placentária é composta por 6 camadas, no lado materno: 1. camada endotelial dos vasos sangüíneos endoteliais; 2. tecido conjuntivo endometrial; 3. camada do epitélio endometrial da cripta; no lado fetal; 4. camada epitelial dos vilos coriônicos, 5. centro do tecido conjuntivo dos vilos coriônicos e 6. endotélio dos vasos sangüíneos e centro dos vilos coriônicos. Nas criptas, as células gigantes binucleadas no placentoma bovino são células que migram dos vilos de origem. Sua função é mais provavelmente fagocítica, a partir do

momento em que foram observadas em áreas de contato entre trofoblasto fetal e epitélio criptal.

MYAGKAYA; VREELING-SINDELAROVA (1976) descrevem que uma das características morfológicas mais impressionantes no placentoma da ovelha é a presença de hematomas na base dos vilos coriônicos, sendo que esta região é chamada de zona arcada. Estes hematomas aparecem aproximadamente no 70º dia de prenhez e com o avanço da prenhez, eles aumentam em tamanho e alcançam seu máximo desenvolvimento no final da gestação, quando os mesmos diminuem em tamanho. Supõe-se que estes hematomas sejam resultado da erosão direta dos capilares maternos nos topos dos septos intervilosos da interface materno-fetal, mas algumas observações histológicas, sugerem que a liberação de sangue é somente esporádica e pode ser induzida, por outro lado, pela erosão direta dos vasos maternos. Em áreas onde ocorrem hematomas, sangue materno se acumula em grandes quantidades opostas ao trofoblasto, e eritrócitos são ingeridos pelas células trofoblásticas. Várias investigações têm mostrado que os processos de eritrofagocitose em mamíferos têm características comuns sob várias condições e envolvem alterações ultraestruturais típicas da membrana dos eritrócitos e hemoglobina sob ataque das enzimas lisossomais.

MYAGKAYA; SCHELLEN; VREELING-SINDELAROVA (1979) estudaram através de microscopia eletrônica de transmissão a digestão dos eritrócitos dentro dos lisossomos das células epiteliais da placenta de ovelhas e observaram que a atividade da fosfatase ácida foi mais intensa no espaço entre a membrana do eritrócito e do lisossomo, sendo que a membrana plasmática do eritrócito continuou sendo vista até o estágio final do processo de digestão e, juntamente com a camada periférica da hemoglobina não digerida, formou-se uma barreira de penetração

adicional das enzimas lisossomais dentro do eritrócito ingerido. A hemoglobina do eritrócito se difunde através da membrana plasmática do eritrócito que contém o lisossomo (eritrolisossomo). A fragmentação do eritrolisossomo é considerada o mecanismo mais eficiente de digestão das células sangüíneas vermelhas, no epitélio trofoblástico da placenta de ovelhas.

WIMSATT (1980) em sua descrição da placenta de ruminantes afirma que hematomas placentários são formados próximos às células trofoblásticas localizadas na zona arcada, onde eritrócitos maternos são ingeridos pelas células trofoblásticas e são reduzidos finalmente dentro de seu citoplasma a aglomerados irregulares de pigmentos não-ferruginosos. Ambas as células binucleadas e as colunares trofoblásticas fazem parte deste processo, mas as células binucleadas são talvez menos eficientes na fagocitose do que as células colunares, pois seu citoplasma é quase invariável e possui menos corpúsculos ou corpos pigmentados que o citoplasma de células colunares. O ferro, que é presumivelmente liberado da hemoglobina e absorvido pelos tecidos fetais, e é, por alguma razão, não demonstrável histoquimicamente, com a abundância com que é observado, em comparação com regiões de eritrofagocitose do cório de outros mamíferos. Esta ausência do ferro não é usual e possivelmente na ovelha é absorvido de alguma forma imperceptível, a qual não é corada pelos métodos usuais.

MYAGKAYA et al. (1984) através do método do ferrocianeto à microscopia eletrônica de transmissão, caracterizou a área hemófaga da placenta de ovelhas e constatou a presença do produto da reação de ferrocianeto em estruturas lisossomais, envolvidas na digestão dos eritrócitos maternos ingeridos pelas células epiteliais, e confirmou que o ferro trivalente é liberado da hemoglobina digerida. O ferro férrico foi também detectado na matriz citoplasmática epitelial, especialmente

nas proximidades das estruturas eritrolisossômicas, entre as superfícies laterais das células epiteliais vizinhas, ao longo do complexo das pregas interdigitadas e a membrana plasmática basal. Em vista destas descrições, os autores afirmam que após a liberação do ferro férrico da hemoglobina materna em seu estado iônico, a distribuição subcelular e, provavelmente, a rota de transporte parece ser similar àquela da placenta do porquinho-da-índia, que é caracterizada pela absorção do ferro da transferrina materna.

Nos placentomas maduros de vacas, parte do trofoblasto contém eritrócitos fagocitados e inclusões, que são moderadamente PAS-positivos. Na periferia do placentoma e entre os vilos primários, o trofoblasto contém grandes conglomerados, os quais estão associados a um pigmento marrom. A coloração com “Turnbull blue” mostrou pequenos grânulos contendo ferro, que estão associados com o pigmento (BJÖRKMAN; SOLLÉN, 1960).

LEISER; WILLE (1975) descreveram na placenta bovina que a reação da enzima fosfatase ácida foi positiva na superfície do epitélio endometrial, e parece estar em conexão com autofagia e a autólise. No estágio de pré-contato e aposição inicial, vesículas de Golgi, lisossomos e grânulos de secreção indicam desempenho de autofagia das células epiteliais do útero para o desenvolvimento do embriotrofo histogênico. Nas glândulas endometriais há indicações de autofagia dependente de fosfatase ácida na sua terça parte superior.

De acordo com MURAI; YAMAUCHI (1986), ocorre o aparecimento de sangue extravasado no espaço entre a base dos vilos coriônicos e septos carunculares no 76º dia de prenhez da vaca. Os autores observaram também o aumento em número e tamanho com o progresso da prenhez, e houve desenvolvimento do hematoma após o 150º dia de prenhez. A camada epitelial do

tecido septal caruncular materno, voltada para a zona arcada, continha uma grande quantidade de gotas lipídicas e mostrava sinais de degeneração, sendo que estes produtos degenerativos pareciam ser absorvidos pelo trofoblasto como um histiotrófo. A camada trofoblástica do cório, que está em contato com o hematoma, mostrou uma distinta eritrofagocitose das células sangüíneas extravasadas com o progresso da gestação. As células trofoblásticas da zona arcada eram colunares altas e mostravam organelas bem desenvolvidas e apropriadas para uma forte fagocitose e, em vista disso, foi realizada reação de fosfatase ácida, a qual foi detectada somente no trofoblasto da zona arcada, região que parece ser um importante canal de transporte de material digerido. As camadas de trofoblasto, que fagocitam as hemácias, freqüentemente invaginam-se dentro do mesênquima. As células trofoblásticas destas camadas invaginadas continham usualmente abundantes pigmentos hematógenos na zona basal, fato este que sugere que a digestão intracelular dos eritrócitos requer um longo tempo. Como conclusão do trabalho, os autores afirmam que a zona arcada da placenta bovina parece constituir uma importante rota de transmissão de ferro da mãe para o feto.

Durante a segunda metade da prenhez dos ruminantes, extravasamento e acúmulo de sangue materno pode ser visto em áreas nas bases dos vilos e, na ovelha, na área interdigitada do placentoma. Este acúmulo resulta da destruição do tecido uterino nos topos dos septos maternos. Este é um achado constante na ovelha e um achado ocasional na vaca. O extravasamento resulta em sangue direcionado para dentro do espaço entre as camadas placentárias materno-fetais. Assim, o extravasamento é dentro da cavidade uterina. As células trofoblásticas na área são vacuolizadas e fagocitam material do sangue extravasado, o que provavelmente representaria e isto é provavelmente um suprimento de ferro para a

hemopoiese fetal. A placenta de carnívoros também possui áreas histiotróficas, em cada margem da zona placentária onde pode se observar macroscopicamente uma área “verde” ou área marginal que representa o sangue materno extravasado dentro do espaço entre a superfície uterina erodida e o trofoblasto e, como consequência, há acúmulos de sangue e degeneração. Os produtos da degeneração são fagocitados pelas células citotrofoblásticas que delineiam este espaço. Embora este seja um local, em que o sangue materno venha a ter contato com o trofoblasto, não deve ser interpretado como uma área hemocorial (LATSHAW, 1987).

MOSSMAN (1987) afirma que pequenas áreas absortivas e fagocíticas do córioalantóide de ungulados (aréola, sistemas arcados, pregas marginais, etc.), são as maiores características desta ordem, embora existam vários subgrupos em que eles não tenham sido relatados. As formas mais comuns são: glândula areolar, um sistema arcado entre a base dos vilos e pregas marginais. Os placentomas das placentas cotiledonárias têm as pregas marginais do córioalantóide cobertas com citotrofoblasto que absorve obviamente as secreções das glândulas endometriais grandes, abrindo-se ao redor da base dos pedúnculos carunculares.

ROY; SAIGAL (1987) demonstraram, na placenta de ovelhas, por meio de reações histoquímicas, que a atividade da fosfatase ácida, enzima envolvida em processos de fagocitose, foi muito forte no septo materno e epitélio criptal. A atividade foi em forma granular fina eventualmente distribuída na área perinuclear. Uma moderada atividade foi vista nas glândulas endometriais e lâmina epitelial.

MIGLINO (1991) relata em placenta de bovinos que o formato dos cotilédones pode ser: circular, elíptico ou quadrangular, sendo a maioria ovóide e alguns reniformes. Em alguns casos, havia fusão de cotilédones vizinhos em diversos graus. O número máximo de cotilédones encontrados foi de 147, o mínimo

de 54, sendo o número médio de 88 por placenta nas fêmeas Holstein, e nas fêmeas Hereford, o máximo foi de 114, o mínimo de 68, sendo então, o número médio de 88 cotilédones por placenta. A paraplacenta é a porção intercotiledonária, ou seja, o órgão placentário desprovido de cotilédones vascularizado por artérias e veias umbilicais.

SANTOS et al. (1996), pesquisando a placenta caprina através de microscopia de luz com colorações de HE e ferrocianeto de potássio, encontraram acúmulos de sangue na interface materno-fetal localizada na zona arcada do placentoma. As principais células do trofoblasto destas áreas apresentam uma intensa atividade fagocítica e foi possível observar eritrócitos com pigmentos de hemossiderina em seu citoplasma. O epitélio trofoblástico destas áreas era mais espesso, com mais aspecto colunar do que o cúbico observado em outras áreas. As células trofoblásticas binucleadas não parecem participar do processo de eritrofagocitose. Os achados mostraram que o processo de fagocitose nos eritrócitos maternos pelo trofoblasto também ocorre na espécie caprina, indicando que isto pode ser um mecanismo de transferência transplacentária de ferro nesta espécie.

FEITOSA-JÚNIOR (1997) descreve o formato dos cotilédones na placenta de búfalas, variando de circular, elíptico ou quadrangular e ainda de formato ovóide e reniforme. Em alguns casos, havia fusão de cotilédones vizinhos em diversos graus. O número máximo de cotilédones encontrados foi de 134, o mínimo de 64, sendo então, o número médio de 92 cotilédones por placenta. A área intercotiledonária ou paraplacenta é a parte da membrana corioalantóide desprovida de placentônios. A vascularização dessa região é realizada pelas artérias e veias funiculares.

Segundo DANTZER (1999) a placenta bovina é um sub-tipo da placenta epiteliocorial, visto que as formações celulares ocorrem por fusão das células binucleadas com as células epiteliais, sendo então denominada de placenta sinepiteliocorial. Em ovinos e caprinos a forma do placentoma é côncava comparado à convexa dos bovinos. O saco vitelínico é muito similar ao do suíno e regride muito precocemente na prenhez. O blastocisto se torna mais longo e começa a imobilizar-se pelo desenvolvimento de uma longa papila trofoblástica celular, a qual se estende dentro da abertura da glândula uterina ao redor do dia 18 pós-coito. Isto é demonstrado pela migração das células trofoblásticas binucleadas para o epitélio uterino, onde elas se fundem com as células epiteliais, que então se tornam trinucleadas. Durante a prenhez, os vilos do septo criptal se tornam longos, aprofundam-se e se ramificam. Isto leva a uma sucessiva diminuição no mesênquima, nos vilos e no tecido conjuntivo no septo criptal. Seus respectivos centros são compostos, principalmente, pelos vasos e rede de capilares. A membrana interhemática contém elementos celulares característicos com desenvolvimento apropriado para transporte e metabolismo epitelial. Inclusões lipídicas basais nas células criptais maternas são características.

PEREIRA et al. (2001) citam em seu trabalho de desenvolvimento do placentônio em búfalas que a eritrofagocitose nestes placentônios aos 9-10 meses de prenhez é uma característica notável desta região de troca materno-fetal.

MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA (2002), realizando reações imunoistoquímicas para demonstrar a atividade da enzima fosfatase ácida em placentas de vaca retidas ou não, observaram que a maioria dos macrófagos nas carúnculas de placentas não-retidas havia forte atividade da fosfatase ácida. Seu formato era irregular com processos citoplasmáticos longos. Nas carúnculas de

placentas retidas, o número de macrófagos mostrou que a atividade e a intensidade da marcação da fosfatase ácida foi diminuída em comparação com as placentas normais. Macrófagos bovinos placentários podem agir, retirando resíduos indesejáveis no tecido caruncular no período pós-parto. Macroscopicamente, as carúnculas de placentas retidas são ovais e rígidas em comparação aos casos normais. Isto pode acontecer devido à falta da função renovadora dos macrófagos na atividade de fagocitose dos elementos celulares que constituem as estruturas carunculares. As carúnculas então permanecem intactas e com as membranas fetais conectadas firmemente ao lado materno da placenta. É possível que os macrófagos da placenta bovina controlem o término normal da prenhez por atenuação do tecido e desconexão da membrana fetal.

Em 1946, WISLOCKI; DEMPSEY descreveram a placenta da gata, realizando reações histoquímicas e visualizaram hemorragias do sangue materno que ocorriam dentro da cavidade uterina, ou seja, entre o epitélio uterino e o cório ao longo da borda do labirinto placentário. Este sangue extravasado e os produtos de sua decomposição eram então absorvidos pelas células colunares da membrana coriônica, a qual provê o crescimento do feto com o suprimento de ferro necessário para a produção das hemácias, sendo que este extravasamento se dá pela ruptura de vênulas dilatadas situadas muito próximas às pregas mucosas na margem placentária e também em septos entre as glândulas uterinas. Estes eritrócitos que são liberados começam a associar-se às secreções glandulares e ao epitélio glandular que está se desintegrando e a absorção ocorre pela camada de citotrofoblasto vascularizado. Os autores supracitados observaram ainda que a localização da enzima fosfatase ácida, as quais estão envolvidas nesse processo de absorção por fagocitose, eram detectadas nos segmentos basais das glândulas

uterinas e, para detectar a presença de ferro, utilizaram o método de “Turnbull blue”, que não marcou o ferro nem no labirinto placentário, nem no epitélio uterino. O ferro pode ocorrer com regularidade e em abundância no extravasamento do sangue materno, que ocorre especialmente ao longo das bordas da placenta zonária, e absorção pelo citotrofoblasto.

LEISER; ENDERS (1980a) descrevem que a paraplacenta da gata se estende da zona polar da cinta placentária, formando uma zona extravasada que é composta por áreas de hematoma, contendo sangue materno extravasado e áreas juncionais paraplacentárias relativamente não modificadas. O trofoblasto nesta área do hematoma é colunar e constitui os vilos coriônicos que estão em contato com superfície formada pelo simplasma materno, tecido uterino degenerado, e sangue desintegrado, assim provendo o embriotrófo histolítico e hemolítico para este citotrofoblasto hemófago.

De acordo com as conclusões de LEISER; ENDERS (1980b), ocorrem hematomas na zona extravasada placentária a termo do gato doméstico, que inclui áreas juncionais paraplacentárias e hematomas marginais; o epitélio uterino se torna altamente proliferativo, especialmente nas pregas ou protusões. Esta superfície hiperplásica e o tecido conjuntivo tornam-se simplásmicos e degenerados, eventualmente, resultando em uma quebra vascular materna. O lume uterino, portanto, contém sangue materno, somando-se às células uterinas. O citotrofoblasto aparentemente fagocita e ingere este material. Vários estágios de fagolisossomos, contendo eritrócitos de variáveis densidades, são vistos nestas células, como estruturas mielínicas, ferritina, glicogênio e gotas lipídicas. Depósitos de ferro cristalóide são observados na lâmina basal e tecido conjuntivo subjacente ao citotrofoblasto hemófago.

O órgão hemófago do carnívoro *Procyon lotor lotor* é uma estrutura sacular altamente vascularizada que se projeta para dentro da cavidade alantóide e emerge da região central da placenta anular. Este órgão aumenta em tamanho e complexidade até aproximadamente o segundo e o terceiro terço da gestação, após esse período ele regride. Morfologicamente é completamente diferente do restante da placenta que é labiríntica e histologicamente se mostra como uma série de ramos e lamelas anastomosadas, que consistem de um fino centro de mesênquima fetal, contendo capilares fetais margeados nos dois lados por células epiteliais colunares fetais altas. Os espaços interlamelares são preenchidos com sangue materno que ganham acesso do lado materno, na base do órgão hemófago, que banha o epitélio colunar fetal. As células deste epitélio suportam várias indicações de serem fagocíticas e parecem ocupar-se essencialmente da ingestão de corpúsculos de sangue materno. O órgão hemófago desempenha um papel particular na troca fetal e é um tipo de mecanismo digestivo extra-fetal de substâncias complexas. É equivalente ao então denominado “hematoma” de placentas de outros carnívoros, mas este termo “hematoma” tem suas implicações patológicas, então o termo descritivo “hemófago” têm sido aplicado às regiões hemofagocíticas da placenta (CREED; BIGERS, 1964).

Na placenta do “ferrets”, GULAMHUSEIN; BECK (1975) encontraram um grande órgão hemófago na região antimesometrial, entre os discos placentários. Neste animal, o sangue materno extravasado está em contato próximo com a membrana cório-alantóide, a qual é revestida por células trofoblásticas que se tornam extensivamente pregueadas com o avanço da gestação. As células vermelhas maternas, que estão em contato com a membrana cório-alantóide, são ingeridas pelas células trofoblásticas, e eritrócitos inalterados, ou fragmentos deles,

são observados em seu citoplasma. Ao microscópio eletrônico de transmissão, as células trofoblásticas possuem microvilos em sua borda apical, e são facilmente reconhecidas pela presença de vacúolos e células vermelhas maternas fagocitadas. O citoplasma continha polirribossomos, elementos do retículo endoplasmático rugoso, extensas regiões de Complexo de Golgi e a presença de muitas mitocôndrias. Outra característica interessante destas células é a presença de grandes agregados de gotículas lipídicas.

MICHEL (1984) descreveu que a placenta de ursos (*Tremarctos ornatus*), como discoidal com um hematoma marginal distinto e histologicamente, é endoteliocorial, a qual é caracterizada por um labirinto placentário e uma zona de transição.

A “tupaia” (*Tupaia belangeri*) desenvolve uma placenta endoteliocorial bidiscoidal, sendo que o histiotrofo secretado pelas glândulas uterinas é absorvido pelo trofoblasto paraplacentário. O histiotrofo, que é rico em ferro, é necessário para a eritropoiese do embrião. No endométrio da “tupaia”, os grânulos contendo ferro, estavam presentes nos macrófagos e células secretoras das glândulas uterinas. O ferro se acumula no endométrio após o parto, com a fagocitose dos eritrócitos pelos macrófagos, como pequenos hematomas. Estes hematomas se originam durante o parto, após o sangramento, dentro do estroma uterino, quando os discos placentários eram desconectados. Após o parto, foram observadas as seguintes consequências estruturais da quebra de eritrócitos fagocitados: grânulos de siderina livres no citosol, siderossomos rodeados por membrana e gotículas lipídicas. Após esses eventos, na próxima gestação do mesmo animal, os macrófagos, contendo siderossomos aproximaram-se das bases das células secretoras das glândulas endometriais. Este fato sugere que o ferro é transferido dos macrófagos para as

células glandulares e, dentro das células glandulares, o histiotrófo rico em ferro era sintetizado e liberado no lume glandular. Então, entre os Eutérios, a eritrofagocitose pós-parto, a transferência de ferro dos macrófagos para as glândulas uterinas e a absorção de ferro pela paraplacenta, representam um mecanismo ancestral de suprimento de ferro para o embrião (ZELLER; KUHN, 1994).

Segundo KING; ENDERS; WIMSATT (1978) o hematoma anular da *Blarina brevicauda*, um insetívoro que habita os Estados Unidos da América, é uma porção especializada da parede do saco vitelínico e também possui uma região especializada do trofoblasto invasivo, a “cortina trofoblástica”, a qual participa ativamente na formação do hematoma, aparentemente pela ruptura de capilares maternos desta área. Os autores verificaram ainda que no trofoblasto da placenta anular, eritrócitos maternos que entraram na cavidade uterina eram fagocitados pelas células do ânulo trofoblástico. Estas células formam um epitélio colunar alto simples com numerosos microvilos que se projetam das suas bordas apicais e núcleos situados basalmente. O citoplasma continha número modesto de mitocôndrias, alguns retículos endoplasmáticos granulares, numerosos polirribossomos livres e, no citoplasma apical, poucas vesículas e túbulos. Uma característica proeminente destas células trofoblásticas foram os numerosos eritrócitos ou fragmentos de eritrócitos maternos encontrados nos vacúolos limitados por membrana no citoplasma. Os eritrócitos parecem estar em diferentes estágios de degeneração, alguns aparecem virtualmente inalterados, enquanto que outros aparecem ligeiramente modificados e ainda outros eram eletrólucos e consistiam de somente uma banda marginal densa. Glicogênio e uma pequena quantidade de gotículas lipídicas estavam espalhados pelo citoplasma.

3.2 Transporte placentário

Vários pesquisadores vêm se preocupando há décadas com o transporte de moléculas da mãe para o feto, dentre eles LEISER; EGLOFF (1990) observaram que a endocitose de material fluido (moléculas solúveis), pinocitose, é ultraestruturalmente evidente nas unidades de membrana basais e apicais de todas as barreiras placentárias epiteliais/endoteliais. As substâncias se tornam extremamente conectadas aos receptores (complexos ligantes-receptores) e então internalizam via invaginações da membrana da célula. As invaginações se transformam em camadas de vesículas, corpos multivesiculares e endossomos, transportando seu conteúdo para o aparato lisossômico, a zona de Golgi e mesmo a membrana da célula basolateral. A pinocitose é também muito comum na parte da célula apical do trofoblasto, sendo visível no gato com a ferritina ou pela hemolisado existente naturalmente do hematoma placentário. O trofoblasto é capaz de realizar a eritrofagocitose, a qual permite que o embrião retire o ferro necessário dos hematomas placentários, como por exemplo, na placenta epiteliocorial da ovelha e cabra ou na placenta endoteliocorial da gata.

Segundo SCHRÖDER (1995), as placentas epitélio e endoteliocorial possuem áreas especializadas nas quais células vermelhas maternas são habilitadas a penetrar no interior das células trofoblásticas e nestas, as células vermelhas maternas são quebradas pelos fagossomos e lisossomos e seu ferro é liberado no citoplasma. É então tanto estocado como ferritina ou passa diretamente para os capilares fetais.

As cavéolas, invaginações da membrana plasmática em forma de frasco, encontradas na superfície apical de várias células, inclusive o trofoblasto (ENDERS;

HENDRICKX; SCHLAFKE, 1983), são responsáveis pela endocitose, transcitose e sinalização celular. As cavéolas ainda estão envolvidas diretamente com a internalização de componentes de membranas (proteínas de ancoragem glicosfingolípídicas e glicosfingofosfatidilinositol), ligantes extracelulares (ácido fólico, albumina, fatores de motilidade autócrina), toxinas de bactérias vírus não-envelopados. Ao contrário da endocitose mediada pela clatrina, a internalização através da cavéola é um evento deflagrado por complexa sinalização (PELKMAN; HELENIUS, 2002).

Segundo ANDERSON (1998) a original intenção da palavra cavéola foi descrever invaginações da membrana na superfície da célula, mas as membranas com características morfológicas clássicas de cavéola não são encontradas em todas as células. Métodos de purificação, usando um marcador da proteína da cavéola, a caveolina, estabeleceram um novo critério para identificar essa membrana. Sua estrutura, função e composição molecular são dependentes das propriedades das membranas lipídicas. Todas as células possuem domínios de membrana plasmática com características biológicas de cavéola, mas somente um conjunto de membranas com tipo particular. O envoltório da cavéola é composto por proteínas integrais de membrana, sendo que uma delas é a caveolina. A expressão da caveolina-1 nas células está relacionada com o aspecto da cavéola invaginada, bem como a presença de material estriado em seu envoltório. Ultraestruturalmente as cavéolas aparecem como uma invaginação da membrana plasmática redonda, de 50-80nm em diâmetro e são comumente encontradas em células endoteliais e musculares. Nas células epiteliais a cavéola é imóvel e suporta o citoesqueleto da actina cortical da membrana plasmática. A cavéola é rica em colesterol e esfingolípídeos, que são essenciais para a formação e estabilidade da cavéola. Se o

colesterol for removido da membrana plasmática, a cavéola desaparece (PELKMAN; HELENIUS, 2002; ROTHBERG et al., 1992; CHANG et al., 1994).

3.3 Ferro

Ferro, um nutriente essencial, é requerido para um grande número de processos biológicos, bem como seus transportadores e receptores, como a transferrina, receptor de transferrina 1 e 2 (sendo este último uma nova molécula), lactoferrina, uteroferrina. De acordo com McARDLE et al. (2003), TRINDER; BAKER (2003); BAKER; BAKER; KIDD (2002); NANDAKUMARAN; DASHTI; AL-ZAID (2002); GAMBLING et al. (2001), VERRIJT et al. (1998), o ferro é também um componente tóxico e há sofisticados mecanismos envolvidos para manter os níveis de ferro entre limites forçados. Há ocasiões específicas em que o requerimento de ferro muda marcadamente, e a prenhez representa a mais significativa delas, onde há um aumento importante no requerimento de ferro. A mudança nos níveis de ferro altera os níveis de outros metais, especialmente o cobre. Para o ferro, a absorção intestinal é o sítio principal de regulação homeostática, enquanto que para o cobre é a excreção biliar. Há conexões entre o ferro e o cobre na absorção e transporte intestinal através de uma proteína plasmática do cobre, a ceruloplasmina e seu homólogo intracelular, a hefaestina (LINDER et al., 2003).

Com a ajuda de diversos fatores, a eritropoiese definitiva é induzida pela junção de uma célula-tronco pluripotente com um macrófago especializado. Na medula óssea do adulto normal, a célula-tronco transforma-se na célula reticular que dá forma ao centro de uma ilha eritroblástica. Permanece em contato próximo com todas as células eritróides descendentes da célula-tronco até sua maturação

completa. Enquanto este contato durar, somente as cadeias alfa e beta (delta) da globina são produzidas, sendo que a produção de cadeias gama é inibida. O “stress” força a célula reticular a liberar as células eritróides serem liberadas e quanto maior este “stress”, mais precoce é a separação. Quando livres da célula reticular, as células eritróides param de produzir cadeias beta e mudam para formar as cadeias gama. O aumento no volume da circulação do sangue é um “stress” potente. Desde que seja relativamente grande no embrião e no feto, a maioria da hemoglobina produzida nestes períodos poderá ser fatal. A qualidade importante da hemoglobina fetal é sua oxidação elevada; isto permite que a célula vermelha fetal senescente seja hemolisada intravascularmente antes que todas as alterações da membrana apareçam. A fração heme é distribuída pela placenta. Desde que nenhuma eritrofagocitose tenha ocorrido, nenhuma bilirrubina é formada. Este processo previne que a bilirrubina alcance o fígado fetal, pois é tóxica a ele (BOGAIR, 1991).

Na placenta humana, uma grande quantidade de ferro é transferida rapidamente e unidirecionalmente da mãe para o feto, através da placenta e um dos primeiros eventos desta transferência é o que envolve a ligação do complexo transferrina-ferro materno na superfície da placenta e subsequente transferência do ferro e liberação da transferrina novamente para a circulação materna. Através de marcação imunocitoquímica em microscopia eletrônica de transmissão foi detectada a presença de transferrina na superfície dos microvilos, bem como na superfície das invaginações pinocíticas (cavéola) da placenta humana (KING, 1976).

Segundo Gomori (1936) o ferro que está contido nos tecidos pode ocorrer de duas formas: um grupo de compostos denominados de “hemossiderina”, onde o ferro reage similarmente ao composto de ferro inorgânico e insolúvel. O outro grupo de compostos de ferro só pode ser demonstrado através de destruição química,

como a incineração. Em material processado para microscopia, há basicamente três métodos, e suas modificações, para demonstrar o ferro: o método azul Berlin de Perls, a reação de ferro sulfido e o método de “Turnbull blue”, método pelo qual se comprovou que a hemossiderina não contém composto ferroso demonstrável e, ainda, para esta reação, não é recomendável a utilização de hematoxilina para a contracoloração. O mesmo autor também afirma que o melhor reagente para microtécnica é uma mistura de partes iguais de ácido hidrocloreídrico a 20% e solução de ferrocianeto de potássio a 10%, durante 30 minutos.

O ferro é absorvido pelo intestino e é anexado a uma molécula de proteína para ser transferida a locais no corpo, onde deve ser utilizada ou estocada. O maior sítio de utilização no corpo é a medula óssea, onde é incorporada a molécula de hemoglobina durante a formação das células vermelhas. O ferro é estocado na forma de hemossiderina, em qual o ferro (na forma férrica), é anexado a uma molécula de proteína. O ferro liberado no corpo pela quebra normal da célula vermelha, volta aos estoques de ferro para subsequente utilização. Em normais a eficiência deste sistema de reciclagem é tal que uma deficiência de ferro raramente iria ocorrer. O intestino delgado normalmente absorve ferro suficiente do excesso de ferro na dieta para equilibrar quaisquer perdas, mas na excessiva perda de sangue o conteúdo da dieta pode ser relativamente inadequada para as necessidades, e mesmo com mecanismo de absorção trabalhando eficientemente, um estado de deficiência de ferro clínico pode ocorrer (BANCROFT; STEVENS, 1982).

FLETCHER; HUEHNS (1968) em seus estudos sobre as funções da transferrina, constataram que no animal gestante, a transferrina pode também carrear ferro para a placenta e assim para o feto. A transferrina não é apenas um carreador passivo, mas desempenha uma parte importante no controle do

metabolismo do ferro. Há mais sítios de ligação de ferro a transferrina do que átomos de ferro no plasma normal, ou seja, não há ferro livre presente. O ferro anexado à transferrina não é utilizado pelas células vermelhas maduras, mas somente pelas células precursoras vermelhas, e é esta utilização é rápida e eficiente para haver a síntese de hemoglobina. O transporte do ferro para a célula pela transferrina não é afetado pela presença de agentes quelantes ou ferro iônico livre. Estes achados indicam que o ferro passa diretamente da transferrina para os receptores apropriados na célula, sendo que o ferro iônico livre não ocorre em nenhum estágio neste processo e a molécula de transferrina então se torna firmemente anexada ao receptor específico, o qual está presente somente nas células vermelhas em desenvolvimento e é perdida quando a síntese de hemoglobina cessa. O ferro é então cedido à célula precursora vermelha provavelmente por uma proteína carreadora específica dentro da célula. A facilidade com que a precursora da célula vermelha libera o ferro da transferrina, comparado com a dificuldade da realização disto *in vitro* em pH fisiológico, sugere que a conexão da molécula no sítio do receptor produz uma mudança na conformação da proteína a qual facilita esta 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. As moléculas de transferrinas anexadas ao ferro possuem muito mais afinidade com os receptores nos reticulócitos do que as moléculas de ferro livre. Os tecidos que mais requerem ferro são a medula óssea e a placenta, respectivamente em ordem de importância. Então, durante a gestação embora o nível de ferro no soro permaneça constante ou decresça, a transferrina total duplica, levando a uma diminuição na

porcentagem de saturação do ferro no plasma. Isto pode ter severas conseqüências; primeiro pode conduzir a um aumento na mobilização de ferro dos estoques, bem como aumento na absorção intestinal; segundo, os sítios na placenta que se ligam à transferrina, podem trabalhar mais eficientemente com baixos níveis de saturação de ferro do que as células vermelhas precursoras. Isto pode explicar o desvio do ferro para o feto, dispensado da mãe quando da deficiência de ferro. No lado fetal da placenta, o ferro no soro é relativamente alto enquanto que o nível de transferrina é baixo, levando a uma alta porcentagem de saturação. Esta situação favorece a deposição de ferro nos estoques de ferro fetal, indicando que o transporte de ferro fetal através da placenta ocorre por algumas formas de processo ativo. Quantidades significantes de transferrina não atravessam a placenta e então o ferro deve ser primeiro destacado da transferrina materna e então passa para o feto por algum sistema de bomba unidirecional. O aumento da renovação do ferro, resultante aumento da atividade eritropoiética, leva ao aumento da absorção de ferro ou aumento de sua mobilização. O *status* do estoque de ferro influencia na absorção: quando há absorção completa: o estoque é deprimido e quando há depleção de absorção, o estoque é aumentado novamente. A renovação do ferro plasmático determina a quantidade de ferro, como a ferritina, incorporada dentro das células da mucosa intestinal, e este ferro controla subsequêntemente a quantidade de ferro na dieta que a célula pode aceitar, quando é envolvida na absorção. A variação na avaliabilidade da transferrina ligada ao ferro dos reticulócitos sugere que este chamado “ferro mensageiro” poderá ser a mesma fração do ferro plasmático como a maioria preferencialmente removida pela medula óssea, que é o ferro das moléculas de transferrina com dois átomos do metal. A quantidade destas espécies ligadas ao plasma não é somente dependente da atividade da medula, mas também depende

da porcentagem da saturação do plasma, o qual por sua vez, é relacionado aos estoques de ferro do organismo. Este mecanismo reduz a absorção do ferro nas células da mucosa, mas não pode ser o único mecanismo ativo para as células da mucosa aceitarem mais ferro da dieta do que o transferido para o plasma, e o excesso de ferro é perdido, quando as células são descamadas das vilosidades intestinais. Além disso, o ferro da hemoglobina ingerido entra nas células da mucosa como um *heme* e conseqüentemente a absorção pode ser por um mecanismo diferente de ferro iônico. Não obstante, a retenção no organismo do ferro da hemoglobina ingerida é controlada pela atividade eritropoiética da mesma maneira que o ferro inorgânico. O *heme* é provavelmente degradado dentro das células mucosas antes deste ferro ser entregue ao plasma. Estes achados sugerem que este é um mecanismo que controla a quantidade de ferro transferido das células da mucosa para ao plasma e relaciona isto com as necessidades do organismo (eritropoiese, etc.) se, inicialmente, entra na célula como ferro inorgânico ou heme. O número de moléculas de transferrina, carreando dois átomos de ferro e a diferença entre esses dois sítios de ligação, faz nos pensar como a absorção é relacionada à necessidade do corpo. O número de moléculas de transferrina, carreando dois átomos de ferro poderá refletir no nível da eritropoiese e o *status* dos estoques e, por sua vez, poderá determinar a quantidade de ferro incorporada dentro das células da mucosa intestinal. Sobreposto a este mecanismo o efeito dos sítios de ligação, os que poderiam ser avaliáveis para carrear o ferro de acordo com a atividade dos tecidos eritropoiéticos poderão mobilizar estoques de ferro, incluindo aqueles nas células mucosas e assim aumentar a absorção. Um mecanismo adicional para aumentar a absorção poderia ser pelo aumento da concentração de transferrina, como ocorre na prenhez e deficiência de ferro. Isto poderia reduzir o número de

moléculas inteiramente saturadas as quais, quando presentes, deprimem a absorção e também aumenta o número de sítios que removem o ferro das células.

O ferro, nutriente fetal mais essencial, está ligado à transferrina na circulação e deve ser transferido por mecanismos mediados através do sinciciotrofoblasto na placenta humana (VANDERPUYE; KELLEY; SMITH, 1986; BIERINGS et al., 1992). Esta camada celular contém receptores para transferrina e os estágios iniciais do transporte de ferro no sinciciotrofoblasto envolvem a ligação da transferrina aos receptores de membrana dos microvilos. Cada ligação é então seguida de endocitose do complexo que recobre as vesículas nas quais a transferrina e o receptor foram detectados. Isto posto, conclui-se que a membrana plasmática basal contém um receptor para transferrina idêntico ao da membrana plasmática dos microvilos, receptor o que está participando da transferência de ferro ou de funções alternativas (VANDERPUYE; KELLEY; SMITH, 1986).

O ferro é essencial à proliferação e maturação das células eritróides. A absorção de ferro, pelo desenvolvimento das células eritróides, ocorre principalmente através da transferrina diférrica e o excesso de ferro não utilizado imediatamente para funções biossintéticas é estocado em forma de ferritina, que é uma proteína essencial na homeostasia, então quando a quantidade de ferro nas células excede sua solubilidade, é necessário concentrar o excesso de ferro para manter essa solubilidade. O excesso de ferro celular é estocado em uma forma solúvel e não tóxica na ferritina (LEIMBERG; KONIJN; FIBACH, 2003; MEYRON-HOLTZ et al., 1999; VAN DIJK, 1988).

Segundo KHATUN et al. (2003), o transporte de ferro da mãe para o feto é essencial para o desenvolvimento normal do feto e anormalidades nos receptores de transferrina no trofoblasto pode haver vários efeitos no metabolismo no ferro fetal.

Este receptor de transferrina do trofoblasto desempenha um importante papel no transporte de ferro para o feto através da interação com a transferrina. O receptor de transferrina do trofoblasto nas células trofoblásticas se liga ao ferro carregado pela transferrina presente no plasma materno e o internaliza, através do ciclo endocítico, durante o qual o ferro é removido da transferrina das células e a transferrina na forma de apo-transferrina retorna ao plasma materno.

Em muitas espécies, as reservas de ferro diminuem no feto durante a prenhez. Estes estoques de ferro são necessários para o rápido crescimento do animal recém-nascido (DOUGLAS et al., 1972). As anemias prevalentes em suínos em desenvolvimento são de preocupação econômica, e o entendimento e a compreensão do comportamento do ferro e sua utilização nos fetos em desenvolvimento é de significância fisiológica para a prevenção e terapia da anemia (HOSKINS; HANSRAD, 1964a; DOUGLAS et al., 1972). Usando injeção de Fe^{59} na circulação materna e observando a distribuição deste em vários tecidos e órgãos fetais, constatou-se que o fígado fetal e o baço exibiam as maiores contribuições para a hematopoiese durante a o início da prenhez, enquanto que esses órgãos e a medula óssea têm sua importância aumentada com o avanço da prenhez. Os resultados deste estudo indicaram que o ferro é transferido através das membranas fetais dos suínos em cada trimestre, com quantidade e taxa aumentando progressivamente em cada estágio da prenhez. Já em ovelhas, os órgãos e tecidos fetais possuem taxas de “turnover” mais altas durante o segundo trimestre que em estágios avançados de gestação. O padrão da hematopoiese fetal mostrou que o fígado e o baço contribuem no desenvolvimento fetal inicial, enquanto que a medula óssea do esterno se torna mais importante no segundo trimestre e todos os tecidos envolvidos na hematopoiese entram em equilíbrio durante os estágios finais da vida

fetal, então, foi relatado que o Fe^{59} atravessa a placenta em todos os estágios da gestação e essa transferência é diretamente ligada à quantidade de ferro requerida para incorporação nos tecidos em desenvolvimento (HOSKINS; HANSRAD, 1964b).

Quando o suprimento de ferro é relativamente abundante, a placenta estoca este componente intracelularmente, em uma forma não tóxica, como a ferritina, que foi localizada na área hemófaga da placenta da ovelha através de microscopia eletrônica de transmissão e microanálise de raios X (MYAGKAYA; DE BRUIJN, 1982).

Na placenta epiteliocorial difusa da porca, o ferro é secretado como uteroferrina pelo epitélio materno na subunidade aréola-glândula da placenta, que é uma glicoproteína de transporte de ferro púrpura com atividade de fosfatase ácida, induzida pela progesterona, que provê ferro para os fetos suínos (RENEGAR; BAZER; ROBERTS, 1982; ROBERTS; RAUB; BAZER, 1986; DANTZER; NIELSEN, 1984; BAZER et al., 1991). A uteroferrina em suínos é transportada pela aréola para dentro de capilares corio-alantóides e então para o feto pela veia umbilical. Dentro do feto a uteroferrina é encontrada no fígado provavelmente para suprir ferro para a hematopoiese ou filtrada pelo rim e transportada na urina para o saco alantóide para servir como um reservatório de ferro temporário.

Há também os derivados da uteroferrina, o Ferro-Zinco-Uteroferrina (FeZnUt) e seu complexo fosfato (FeZnUt.PO_4) bem caracterizados por WANG et al. (1996) por espectroscopia de absorção de raios-X.

BAKER; MORGAN (1973), estudando a transferência de ferro em placentas de gatas usando ^{59}Fe e radioiodo, concluíram que o endotélio materno da placenta dessas fêmeas age como uma barreira na absorção do ferro ligado à transferrina (glicoproteína carreadora específica para ferro III) do plasma sangüíneo, então, a

taxa de transferência de ferro para os fetos pelo plasma materno é inadequada e outro suprimento, como os eritrócitos maternos, podem suprir a maioria do ferro necessário para os fetos.

Através da microscopia eletrônica de transmissão, microanálise de raios X e reação histoquímica de fosfatase ácida, foi constatado que partículas distintas de ferritina não foram observadas no espaço extracelular, nem nas células epiteliais basais ou luminais. A ferritina intracelular foi observada aparentemente livre no citoplasma, em quantias variáveis. Túbulos de transferência e corpos densos foram localizados basalmente nas células secretórias, sendo que ambas essas organelas continham partículas de ferritina que mostraram sítios reativos para fosfatase ácida. As células ciliadas se diferenciam por possuírem os corpos densos localizados apicalmente, contendo numerosas partículas de ferritina. Então, os autores constataram que a ferritina nativa nas células com transporte de ferro hormonalmente regulado suporta o conceito de que os túbulos de transferência, como parte do complexo lisossômico, fazem parte da via endocítica, nas células secretórias e indicam que a ferritina possui um transporte intracelular ou de estocagem intermediária (DANTZER; NIELSEN, 1984; LEISER; EGLOFF, 1990).

RAUB; BAZER; ROBERTS (1985) estudaram por ouro imunocoloidal o transporte de uteroferrina no endométrio de porcas e constataram que essa proteína era localizada exclusivamente nas células não-ciliadas do epitélio glandular, onde pareceu seguir uma rota comum de glicoproteína secretória (retículo endoplasmático rugoso, golgi, vacúolos condensados e grânulos secretórios).

No caso dos eqüinos, a uteroferrina, proteína de ligação com o ferro do plasma, é um marcador confiável para o epitélio que media o transporte ativo transcelular de ferro. WOODING et al. (2000), utilizando métodos imunoistoquímicos

para mapear a uteroferrina na interação materno-fetal desses animais, constataram que vesículas de transporte, provavelmente endossômicas/lisossômicas, apicais nas células colunares altas das aréolas, continham a uteroferrina. Em contraste, nas células epiteliais glandulares e no lume areolar, a uteroferrina foi encontrada na área do Golgi. Na região dos microcotilédones não houve marcação para esta proteína.

A uteroferrina é capaz de catalizar a peroxidação lipídica na presença de concentrações do ácido ascórbico que são similares a do lume uterino e fluidos fetais. Quando há descontrole da peroxidação lipídica o meio intra-uterino provavelmente possui mecanismos para prevenir esta reação. Tanto a proteína de ligação ao retinol, quanto a transferrina inibem a reação *in vitro*. Essas duas proteínas protegem os tecidos dos danos causados pela uteroferrina *in vivo*, então, parece que a secreção e/ou concentração dessas várias proteínas nos vários compartimentos intra-uterinos, poderia estar correlacionada com a concentração de uteroferrina (VALLET; CHRISTENSON; MCGUIRRE, 1996).

3.4 Glândulas uterinas

As glândulas uterinas estão presentes no útero de mamíferos e se desenvolvem após o desenvolvimento em ovelhas. Tipicamente a adenogênese endometrial envolve diferenciação do epitélio glandular, seguido pela invaginação e extensivo espiralamento e ramificação tubular através do estroma uterino do miométrio. Este processo requer alterações em sítios específicos na proliferação celular e remodelamento na matrix extracelular, bem como nas interações parácrinas célula-célula e célula-matrix extracelular, que sustentam as ações de hormônios específicos e fatores de crescimento. Estas glândulas secretam uma variedade de

moléculas denominadas de histiotrófo, acredita-se que são essenciais para o suporte materno e sobrevivência e desenvolvimento do conceito de mamíferos (GRAY et al., 2001a; GRAY et al., 2001b; ZELLER; KUHN, 1994). Os componentes do histiotrófo uterino incluem enzimas, citocinas, fatores de crescimento, íons, hormônios, glicose, proteínas de transporte e moléculas de adesão (GRAY et al., 2001a; GRAY et al., 2001b).

As glândulas endometriais de ruminantes se comunicam com a cavidade uterina através de um curto ducto rodeado por um epitélio colunar similar ao presente na superfície do endométrio. Os ductos apareciam abertos em todos os estágios da fase tardia e o lume freqüentemente continha vesículas mucóides ou ocasionalmente material celular. As células glandulares eram colunares com núcleo basal oval ou redondo (AITKEN et al., 1973; AITKEN, 1974; AITKEN, 1975; HOYES, 1972). Já ao microscópio eletrônico de transmissão as células epiteliais das glândulas uterinas eram unidas por desmossomos ocasionais e, próximo à superfície, por complexos juncionais, os quais eram compostos por uma zônula oclusiva superficial, a zônula aderente e a mácula aderente associada. Na base das células epiteliais, havia processos citoplasmáticos de interdigitação e o núcleo era basal em posição e era caracterizado por uma cromatina uniformemente distribuída ou condensada e o nucléolo era altamente diferenciado. O citoplasma continha numerosos polirribossomos, grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias eletrondensas que estavam dispostas entre os ribossomos ou entre os sacos do retículo endoplasmático e, ocasionalmente, na região do Complexo do Golgi. Grandes vacúolos contendo um material do retículo ou depósitos periféricos eletrondensos, se não substância similar, estavam presentes também no citoplasma supranuclear, e foram freqüentemente relacionadas ao Complexo de Golgi e à

superfície da membrana. Por sua vez, algumas mitocôndrias estavam freqüentemente mal preservadas, e algumas pareciam estar em processo de transformação em estruturas que se assemelhavam aos vacúolos supranucleares, os quais variavam em tamanho, mas eram ainda visualizados freqüentemente próximos ao Complexo de Golgi altamente desenvolvido. Na região apical destas células epiteliais da glândula uterina ainda havia microvilos semelhantes a dedos e cílios (HOYES, 1972).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho, foram utilizados placentônios de 51 búfalas em diferentes fases da prenhez, provenientes do *campus* de Ilha Solteira (SP)-UNESP e de abatedouros-frigoríficos em São João da Boa Vista-SP, Pirassununga, Feira de Santana-BA e Belém-PA.

Considerando que a prenhez da búfala, segundo FONSECA (1986) é de 308 a 318 dias (10 meses), o material foi dividido em 5 grupos de acordo com o tempo de gestação: grupo 1 – seis fêmeas com 60 a 90 dias de prenhez (2-3 meses), grupo 2 – vinte e duas fêmeas com 120 a 184 dias de prenhez (4-6 meses), grupo 3 - sete fêmeas com 210-240 dias de prenhez (7 meses), grupo 4 - doze fêmeas com 241 a 270 dias de prenhez (8-9 meses), grupo 5 – quatro fêmeas com 271 a 318 dias de prenhez (10 meses). Imediatamente após o sacrifício, todos os animais tiveram a cavidade abdominal aberta para retirada do útero e seu conteúdo fetal.

A seguir, foi realizada uma incisão no sentido craniocaudal do cérvix uterina, em direção ao corno gestante. As membranas fetais foram abertas e o feto e os líquidos fetais removidos. As medidas cefalococcígeas dos fetos (CR=“Crown-Rump”) foram tomadas para determinar a idade de prenhez, conforme as fórmulas estabelecidas por ABDEL-RAOUF; EL-NAGGAR (1969), onde $Y=74+(9/2)X$ (para fetos menores que 20 cm) e $Y=74+(9/4)X$ (para fetos maiores que 20 cm), sendo que X é o comprimento ápice-sacro (A-S), equivalente à distância do ponto mais alto da cabeça (frente) até a base da cauda, acompanhando a curvatura do corpo, e Y é a idade da prenhez a ser calculada inicialmente em dias. Após a determinação da idade, procedeu-se à identificação dos fetos.

Após inversão do útero, as áreas de interesse foram analisadas macroscopicamente e os placentônios próximos ao feto foram isolados e fixados, por perfusão e imersão, com solução de paraformaldeído a 4% (Paraformaldehyde, Sigma Chemical Co., USA) em tampão fosfato 0,1M pH 7.4 ou em solução aquosa de formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M pH 7.4, para microscopia de luz, histoquímica ou em glutaraldeído a 2,5 % (Glutaraldehyde grade I:70% aqueous solution, Sigma Co., USA) preparado no mesmo tampão, para microscopia eletrônica de transmissão. Ainda imersos no fixador, fragmentos menores dos placentônios foram então recortados e imersos novamente nos fixadores.

4.1 Preparação das amostras para observação ao microscópio de luz

Para observação ao microscópio de luz, as amostras foram processadas para inclusão em Paraplast®¹ e Histoiresina®², como descrito abaixo.

4.1.1 Processamento em Paraplast®

Os placentônios foram recortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm e colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4 % em PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline-DPBS, Gibco Co., USA) ou em solução aquosa de formaldeído a 10% e PBS. Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em paraplast. Foram então obtidos os cortes, com espessura de 4 ou 5µm e rotineiramente corados por H&E, tricrômico de Gomori, reação

¹ Paraplast Embedding Media-Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA

² Hydroxyethyl methacrylate, Histoiresin, Leica, LKB 2218-500, Sweden

histoquímica de PAS contracorada com hematoxilina de Harris, reação histoquímica de Perls e reação histoquímica para detectar atividade da enzima fosfatase ácida (BANCROFT; STEVENS, 1982).

4.1.2 Processamento em Historesina®

Para inclusão em metacrilato, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4 % em PBS. Após a fixação, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100 %) e finalmente infiltrado na proporção de 1:1 em solução infiltradora (50 ml de resina básica [glicol-metacrilato] e 0,5 ml de ativador [peróxido de benzoila] / álcool 95% durante 2 horas e deixado para polimerizar em uma mistura de resina (15 ml de solução infiltradora e 1 ml de endurecedor, derivado do ácido barbitúrico-DMSO) à temperatura ambiente, de 4 a 6 horas ou em estufa a 37 °C, por 1 hora.

Foram então obtidos os cortes, com espessura de 2 a 3 µm, que por sua vez foram rotineiramente corados por azul de Toluidina, azul de metileno e fucsina básica, hematoxilina - floxina e reação histoquímica de PAS contracorada com hematoxilina de Harris.

4.2 Preparação das amostras para observação ao microscópio eletrônico de transmissão

Para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4. Uma vez fixados, os fragmentos foram lavados no mesmo tampão fosfato e pós fixados em

tetróxido de ósmio³ a 1 % por 2 horas. Após novas lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (de 70 % a 100 %) terminando em óxido de propileno⁴.

Durante 12-16 horas, as amostras ficaram mantidas sob rotação em uma mistura 1:1 de óxido de propileno e resina Spurr⁵. Em seguida, esta mistura foi substituída por resina pura, onde os materiais permaneceram por mais 4 a 5 horas.

Após esse período as amostras foram embebidas com a resina pura em moldes e foram orientadas de modo que a face de corte do bloco contivesse sempre a interface materno-fetal para observação. Uma vez incluídas, as amostras permaneceram em estufa a 60 °C por 72 horas para permitir a polimerização da resina.

Para a localização de áreas adequadas contendo ou não a interface materno-fetal, os blocos foram cortados em um ultramicrotomo Leica ULTRACUT UCT®. Cortes semifinos de 1µm de espessura foram então obtidos e corados com uma solução aquosa aquecida de borato de sódio 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de Toluidina para observação ao microscópio de luz.

Localizadas as regiões para o estudo sub-celular, no mesmo microtomo foram obtidos cortes ultrafinos, prateados, de cerca de 60nm de espessura.

Estes cortes foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2 % em água destilada, durante 5 minutos, e pelo citrato de chumbo 0,5 % em água destilada, durante 10 minutos.

A observação sub-celular e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico Zeiss EM90®.

³ (Osmium tetroxide 4% w/w solution in water, Polysciences, Inc., USA)

⁴ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc., USA

⁵ Spurr's kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Nossos resultados referem-se a caracterização morfológica da eritrofagocitose placentária em búfalas, nas diferentes fases de prenhez estudadas.

5.1 Caracterização morfológica da área hemófaga da placenta de búfalas

Os hematomas são assim designados por mostrarem-se como extravasamentos de sangue na região da interface materno-fetal, ou seja, na base dos vilos fetais e topo dos vilos maternos (fig. 1, fig. 2b, fig. 3, fig. 4a, fig. 5, fig. 6, fig. 7 e fig. 8). Como o sufixo “oma” é utilizado para denominar neoplasias de modo geral; optamos então por nomear esta região de área hemófaga, como sugerido por CREED; BIGERS (1964) e MYAGKAYA et al. (1984). Nossos estudos, observamos nesta área o acúmulo de sangue com hemácias maduras, hemácias maternas (fig. 4a, fig. 10). Descartamos a possibilidade destas células serem fetais, pois se assim o fossem, estas hemácias seriam blastos e sua morfologia seria diferenciada. De outra parte, não haveria justificativa para estas hemácias serem fetais, pois a necessidade maior de suprimento de nutrientes e íons (no caso específico o Ferro) é do feto e não da mãe.

Na interface materno-fetal, as áreas de trofoblasto eram muito desenvolvidas nos bufalinos e foram claramente evidenciadas, apresentando um epitélio simples colunar, que muitas vezes, de acordo com a superfície de corte, possuía um aspecto estratificado (fig. 2b). Vários vilos foram identificados e suas estruturas da relação materno-fetal foram diferenciadas (fig. 1, fig. 2a, fig. 3).

O aspecto sinepiteliocorial da placenta da búfala foi confirmado, e grandes quantidades de células binucleadas foram vistas no trofoblasto (fig. 2a, fig. 9, fig. 10a).

As áreas de junção materno-fetal mostraram-se justapostas com raras porções, onde o trofoblasto não aparecia contínuo devido ao seu adelgaçamento em algumas regiões. Os hematomas, que foram descritos em outras espécies, foram confirmados na espécie bufalina, causando de certa forma grande expectativa quanto a sua função.

Os cortes histológicos processados e minuciosamente analisados através de seqüenciamento num total de aproximadamente 2000 lâminas mostraram, que estas estruturas por nós estudadas, surgiam esporadicamente, uma vez que não estavam presentes em todos os placentônios coletados.

5.2 Observações nas diferentes fases da prenhez estudadas:

As amostras coletadas a partir de 4-5 meses de prenhez, mostraram a presença ocasional de acúmulo de sangue materno extravasado na interface materno-fetal com eritrofagocitose pelo trofoblasto. Analisando todas as fases de gestação, os hematomas foram então observados a partir do 4º mês (fig. 4a). Seu aspecto permaneceu semelhante em todas as fases, demonstrando somente uma grande variação morfológica microscópica. Estes dados nos impediram de descrever um formato para estas estruturas. Ora elas encontravam-se esparramadas entre a interface materno-fetal (fig. 5), ora eram muito concentradas nesta mesma interface (fig. 5a, fig. 10a). Esta morfologia podia estar associada a uma maior aderência das

células trofoblásticas com células do epitélio uterino, através de junções nestas regiões, onde o extravasamento estava mais concentrado.

Quando presentes, estes hematomas estavam localizados principalmente no ápice dos vilos maternos, o que correspondia à base dos vilos coriônicos. Em algumas amostras observou-se extravasamento de plasma no interstício entre os epitélios uterino e trofoblástico (fig. 4a). As células trofoblásticas apresentavam hemácias em seu interior, sugerindo uma possível transferência de ferro para o feto (fig. 3b, fig. 6, fig. 10, fig. 13, fig. 14, fig. 15). As células trofoblásticas binucleadas não foram visualizadas realizando fagocitose. Acredita-se que o feto utilize esse íon extravasado da mãe para sua hematopoiese.

Dentro da região do sangue extravasado do hematoma foram observados também debris celulares e prováveis células em apoptose (fig. 5a).

Na região dos hematomas, foram observados vesículas e grânulos nas células trofoblásticas (fig. 2b, fig. 6d, fig. 9b), que foram melhor elucidados com a microscopia eletrônica de transmissão.

As reações histoquímicas de Perls para detectar a presença de ferro realizadas nos placentônios foram negativas na placenta de búfalas, ao passo que as reações histoquímicas para detectar a presença da enzima fosfatase ácida foram positivas nos placentônios (fig. 7a), principalmente no mesênquima e trofoblasto, com menor marcação no estroma endometrial, indicando processo de fagocitose. Essa intensa marcação da fosfatase ácida, no mesênquima, ocorre provavelmente devido ao fato do trofoblasto se invaginar no mesênquima e também pelo mesênquima ser composto de fibroblastos, células com potencial de se transformarem em outras.

No topo dos vilos fetais ainda foi visualizado acúmulo de secreções PAS positivas (fig. 4a), indicando a presença de material mucóide nesta região, material este produzido pelas células trofoblásticas, principalmente as células binucleadas que se coram mais intensamente com esta reação. Isto pode ser decorrente de hormônios glicoprotéicos, como o hormônio lactogênio placentário, presentes na célula binucleada da placenta de búfalas, que possui a função de estimular o crescimento fetal e o desenvolvimento da glândula mamária (Carvalho, 2000).

Figura 1 - a) Esquema de um placentônio de búfalas, mostrando sua estrutura: parte fetal (cotilédone), parte materna (carúncula uterina) e a área hemófaga. O pedúnculo caruncular, endométrio, glândulas endometriais e o cório liso. b) Esquema em maior aumento da área hemófaga.

Figura 2 – a) Fotomicrografia em menor aumento da morfologia do placentônio de búfalos aos 6,5 meses de prenhez, mostrando a base do vilo fetal (Fe), topo dos vilos maternos (Ma), mesênquima (M), vasos fetais (vf). Histoiresina, azul de Toluidina, 50X. b) Detalhe da interface materno-fetal (10 meses de prenhez), que apresenta uma área de sangue extravasado (SE), células binucleadas (B) em provável migração pelo hematoma. Epitélio uterino (EU), vacúolos (v), trofoblasto (T), vasos fetais (vf) e mesênquima (M). Histoiresina, azul de Toluidina, 300X.

Figura 3 – a) Esquema e b) fotomicrografia, detalhando a interface materno-fetal do placentônio de búfalos aos 10 meses de prenhez. Área de hematoma, mostrando hemácias (H), sendo fagocitadas pelo epitélio trofoblástico (setas). Notar a presença de células binucleadas (B) no trofoblasto (T) e no extravazamento de sangue. Epitélio uterino (EU). Paraplast, Tricromo de Gomori, 640X.

Figura 4 – a) Fotomicrografia de placentônio de búfalo aos 4-5 meses de prenhez, onde se observa extravasamento de plasma (P) no interstício entre os epitélios uterino (EU) e trofoblástico (T), com a presença de hemácias (E). Em um outro vilão fetal, observa-se a presença de secreção (S), confirmada em b). Mesênquima (M). Histoiresina, H&E, 50X. b) Observar a secreção PAS positiva no vilão fetal (S). Trofoblasto (T), mesênquima (M). 6 meses de prenhez. Histoiresina, reação de PAS, 500X.

Figura 5 – a) Interface materno-fetal, onde foram observados debris celulares (d) e prováveis células em apoptose (a) na área de sangue extravasado. Epitélio uterino (EU), trofoblasto (T), células binucleadas (B), hematoma (H) e mesênquima (M). 6-7 meses de prenhez. Histoiresina, H&E, 150X. b) Hematoma (H) que se apresenta concentrado na interface materno-fetal do placentônio de búfalo aos 10 meses de prenhez. Trofoblasto (T), epitélio uterino (EU), vasos fetais (vf), mesênquima (M). Histoiresina, azul de Toluidina, 650X.

Figura 6 – Fotomicrografias de luz de cortes semi-finos, demonstrando a área hemófaga (H), epitélio uterino (EU), hemácias fagocitadas pelo trofoblasto (setas), mesênquima (M), vesículas lipídicas (L). a) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 736X. b) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 1.200X. c) 10 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 60X. d) 4-6 meses de prenhez. Resina Spurr. Azul de Toluidina. 1.200X.

Figura 7 – Fotomicrografias de luz da reação de fosfatase ácida. a) Reatividade da enzima no placentônio de búfalas aos 8 meses de prenhez. 250X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. b) Reatividade da enzima na glândula endometrial. 448X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. As fotos menores inseridas em a) 125X e em b) 120X são os controles negativos.

Figura 8 – Fotomicrografias de luz da reação de Perls. a) Reatividade do ferro férrico (coloração azul) na glândula endometrial aos 4-6 meses de prenhez. 446X. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro. b) Controle positivo: fígado de camundongo. Paraplast. Contracoloração de vermelho neutro, 312X.

O material destinado à microscopia eletrônica de transmissão revelou as hemácias extravasadas na interface materno-fetal em vários graus de digestão intracelular e, conseqüentemente, de diferentes eletrondensidades (fig. 9b, fig. 13a, fig. fig. 14, fig. 15). A hemácia parece entrar na célula trofoblástica pelos microvilos que existem em seu ápice (fig. 13), ou por meio de endocitose pelas cavéolas (fig. 12), que são invaginações na superfície da célula que formam vesículas pinocíticas e ainda são responsáveis por sinalização celular. Próximo a esta região foi encontrado um grande número de mitocôndrias, provavelmente envolvidas em transporte ativo de substâncias para dentro das células trofoblásticas.

Foi possível observar também o eritrofagossomo com a hemácia sendo digerida em seu interior (fig. 14), e havia muitos resíduos provenientes da degradação destas. Algumas delas apareciam degradadas nos espaços intercelulares. Havia um retículo endoplasmático rugoso muito bem desenvolvido, sugerindo alta síntese protéica nas células trofoblásticas. Ainda nestas células estavam presentes muitas gotículas lipídicas, grânulos de secreção de diferentes tamanhos e eletrondensidades. Também observamos na interface materno-fetal da placenta de búfalas aos 10 meses de prenhez um hematoma em início de formação (fig. 10b), no qual as células estão se conectando através do glicocálix das células às hemácias e as mesmas ainda não foram englobadas (fig. 11b, fig. 12c). Outra estrutura interessante encontrada foi um tipo de pseudópode (fig. 11a, fig. 12c), em uma célula epitelial do trofoblasto, que margeia esse hematoma e a presença de microfilamentos (fig. 11a), indicando ancoragem que ocorre entre as células da junção materno-fetal.

Então, devido a todas as características supracitadas, podemos afirmar que o epitélio da chamada “zona arcada” da placenta de búfalas é um epitélio

modificado, pois possui características absorptivas, fagocíticas e secretórias, que, provavelmente, contribuem para a nutrição do feto.

Figura 9 – Eletromicrografia de transmissão mostrando a interface materno-fetal. a) Parte materna (M), parte fetal (F), células binucleadas (B) na parte fetal, que contém muitos grânulos de secreção (g) de diferentes eletrondensidades em seu citoplasma. Capilar (C). 7 meses de prenhez. Escala= 9,33 μ m. b) Interface materno-fetal mostrando partículas de diferentes eletrondensidades (e). Eritrócito digerido (ED). Escala= 9,58 μ m. c) Detalhe de um capilar contínuo, presente nesta região de contato materno-fetal, com um polimorfonuclear (P) dentro dele. 7-8 meses de prenhez. Escala= 2,77 μ m. d) Interface materno-fetal. Trofoblasto (T), hematoma (H), epitélio uterino (EU), capilar (C), polimorfonuclear (seta). Escala= 9,72 μ m.

Figura 10 – a) Fotomicrografia em maior aumento, detalhando a interface materno-fetal do placentônio de búfalos aos 10 meses de prenhez. Área de hematoma, mostrando hemácias (H), sendo fagocitadas (E). Notar a presença de células binucleadas (B) no trofoblasto (T) e no extravasamento de sangue. Epitélio uterino (EU). Histoiresina, azul de Toluidina. 800X. b) Eletromicrografia de transmissão demonstrando uma grande área de extravasamento de sangue materno. Trofoblasto (T), hemácias (H), mesênquima (M). Escala= 6,48 μm .

Figura 11 - Placenta de búfala aos 10 meses de prenhez. Eletromicrografias do sangue materno extravasado em detalhe. a) Células trofoblásticas (T), eritrócitos (H), pseudópode (seta), microfilamentos (m). Escala= 0,47 μ m. b) Detalhe do eritrócito (H) conectado a uma plaqueta (P) pelo glicocálix (seta). Microtúbulos (setas duplas interrompidas), grânulos eletrondensos (g). Escala= 0,5 μ m.

Figura 12 - a) e b) Eletromicrografias mostrando detalhes do epitélio trofoblástico que está em contato com o sangue extravasado. Há a presença de cavéolas no trofoblástico (setas), que estão envolvidas na endocitose. 10 meses de prenhez. c) Outra região do epitélio trofoblástico (T) próximo a um eritrócito (E). Estrutura semelhante a um pseudópode (setas), glicocálix (g). 10 meses de prenhez. a) Escala= $0,10\mu\text{m}$; b) Escala= $0,10\mu\text{m}$; c) Escala= $0,26\mu\text{m}$.

Figura 13 - Eletromicrografia a) e esquema b) da placenta de búfalas aos 10 meses de gestação. Parte apical de células trofoblásticas, unidas por desmossomos (d), que está em contato com a área hemófaga (H), com uma grande quantidade de microvilos (M) e mitocôndrias (Mt). Dentro das células trofoblásticas há muitos eritrócitos, sendo digeridos (setas) e um corpúsculo residual (CR). Núcleo da célula trofoblástica (NT). Escala= 1,57 μ m.

Figura 14 - Placenta de búfalas aos 10 meses de prenhez. Eletromicrografias do epitélio trofoblástico (T). a) Células epiteliais trofoblásticas com eritrócitos dentro delas sendo ingeridos na região supranuclear, em várias fases de digestão (E), mitocôndria (M), complexos de eritrolisossomos (seta fina). Fagossomos (seta cheia) com eritrócitos (E) são notados. Escala= 2,77 μ m. b) Detalhe de a): Eritrócitos, de diferentes eletrondensidades, estão sendo digeridos. Escala= 0,91 μ m.

Figura 15 - Placenta de búfalas. Eletromicrografias da interface materno-fetal. a) Células trofoblásticas (T), eritrócito (E), vesículas endocíticas (seta). 7-8 meses de prenhez. Escala= 2,52 μ m. b) Mesma região de a), mas aos 7-8 meses de prenhez. Escala= 0,4 μ m.

5.3 Região Interplacentomal

A região interplacentomal está situada entre os placentônios, (fig. 1a, fig. 16, fig. 17, fig. 18) que é composta de endométrio (materno) e cório liso (fetal). No endométrio, foram visualizadas as glândulas endometriais que são importantes áreas de transferência de substâncias da mãe para o feto em várias espécies animais, incluindo o ferro. Devido a este fato dedicamos atenção a elas e pudemos observar que o epitélio dessas glândulas endometriais era colunar (fig. 17, fig. 18b) e havia a presença de microvilosidades (fig. 18a) na região apical, seu núcleo era basal e possuía a cromatina condensada (fig. 17). Ainda foi observada considerável quantidade de vesículas intracitoplasmáticas claras, em posição supranuclear nas células epiteliais das glândulas uterinas, que podem estar associados ao Complexo de Golgi, principalmente nas amostras de final de prenhez (fig. 17, fig. 18b). Na luz destas glândulas havia restos celulares (fig. 17, fig. 18) e secreções mucóides PAS positivas, as quais foram confirmadas ao microscópio de luz (fig. 16b). Foi confirmada também a reatividade da região interplacentomal, principalmente das glândulas uterinas, a enzima fosfatase ácida que detecta atividade fagocítica (fig. 7b) e à reação de “Perls” que expõe o ferro férrico (fig. 8a). Esse ferro detectado pela reação de “Perls” em meio às secreções das glândulas uterinas e em seu epitélio será confirmado por meio de reação imunoistoquímica específica para uteroferrina em estudos subseqüentes.

Figura 16 - Fotomicrografias de luz da região interplacentomal da placenta de búfalas aos 4-6 meses de prenhez. a) Endométrio (E), glândulas uterinas (setas), vasos sangüíneos (estrela). b) Secreção PAS positiva (seta) na glândula endometrial aos 4-6 meses de prenhez. c) Endométrio (E), glândulas uterinas (setas), vasos sangüíneos (estrela) e miométrio (M). a) 50X; b) 800X e c) 52X.

Figura 17 – Esquema a) e eletromicrografia de transmissão b) mostrando as glândulas uterinas encontradas no endométrio (En). Epitélio colunar (E) com núcleo basal (N), microvilos na região apical (M) e vesículas na região supranuclear (v), lume da glândula (L), leucócito (seta), Golgi (G), mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático rugoso (E). 5-6 meses de prenhez. Escala= 5,83 μ m. Na foto menor, observa-se o detalhe da vesícula (v). 5-6 meses de prenhez. Escala= 0,40 μ m.

Figura 18 - Eletromicrografias de transmissão da glândula uterina. a) Detalhe dos complexos juncionais das glândulas uterinas (setas). Lume da glândula (L), microvilos (m). 5-6 meses de prenhez. Escala= 2,65 μm . b) Nesta amostra de 10 meses de prenhez, notar a presença da maior quantidade de vesículas que na amostra de 5-6 meses de prenhez. Lume da glândula (L). Escala= 7,77 μm .

6 *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

A interação materno-fetal de búfalas apresentou áreas fagocíticas e absorptivas da membrana cório-alantóide e região interplacentomal. Exceto aos de 2-3 meses de prenhez, a placenta, apresentou áreas hemófagas localizadas entre o topo dos vilos maternos e a base dos vilos fetais, região que corresponde à zona arcada da placenta de ovelhas e cabras, a qual foi excessivamente estudada nesses animais por MOSSMAN, 1987; WIMSATT, 1950; LAWN; CHIKUOINE; AMOROSO, 1969; WIMSATT, 1950; MYAGKAYA; SCHELLENS; VREELING-SINDELAROVA, 1979, MYAGKAYA et al., 1984; MYAGKAYA; DE BRUIJN, 1982 e SANTOS et al., 1996.

O epitélio da “zona arcada” da placenta de búfalas, que compreende a região do topo dos vilos maternos que está em contato com a base dos vilos fetais, é um epitélio modificado, pois apresenta propriedades absorptivas, fagocíticas e secretórias que possuem a função de nutrir o feto. É assim caracterizado por possuir um epitélio modificado devido à presença de eritrócitos fagocitados dentro das células epiteliais trofoblásticas, muitas vesículas lipídicas, cavéolas (vesículas endocíticas), retículo endoplasmático rugoso muito desenvolvido, grânulos de secreção. Estas estruturas estavam presentes em nossas amostras de placentas de búfalas, e também foram encontradas nas placentas de vacas por MURAI; YAMAUCHI, 1986; DANTZER, 1999; LEISER; EGLOFF, 1990, em ovelhas e cabras por MOSSMAN, 1987; WIMSATT, 1950; LAWN; CHIKUOINE; AMOROSO, 1969; WIMSATT, 1950; MYAGKAYA; VREELING-SINDELAROVA, 1976; MYAGKAYA; SCHELLENS; VREELING-SINDELAROVA, 1979; MYAGKAYA et al., 1984; MYAGKAYA; DE BRUIJN, 1982; SANTOS et al., 1996, em carnívoros e mustelídeos

por WISLOCKI; DEMPSEY, 1946; LEISER; ENDERS, 1980a; LEISER; ENDERS, 1980b; CREED; BIGERS, 1964; GULAMHUSEIN; BECK, 1975, em insetívoros por KING; ENDERS; WIMSATT, 1978.

Vários autores sugeriram que as áreas hemófagas ou “hematomas” placentários possuem a importante função de transferência de ferro da mãe para o feto, opinião que surgiu mediante resultados de experimentos utilizando técnicas de microscopia de luz, eletrônica de transmissão, imunoistoquímica e imunomicroscopia eletrônica com marcação para os transportadores de ferro, microanálise de raios X e injeção de Fe^{59} na circulação materna (MOSSMAN, 1987; SEAL; SINHA; DOE, 1972; LAWN; CHIKUOINE; AMOROSO, 1969); WIMSATT, 1950; MURAI; YAMAUCHI, 1986; LATSHAW, 1987; SANTOS et al., 1996; WISLOCKI; DEMPSEY, 1946; LEISER; ENDERS, 1980a, LEISER; ENDERS, 1980b; ZELLER; KUHN, 1994; LEISER; EGLOFF, 1990; HOSKINS; HANSRAD, 1964b; DANTZER; NIELSEN, 1984; MYAGKAYA; DE BRUIJN, 1982; BAKER; MORGAN, 1973. Em nossas amostras de placentas de búfalas realizamos reação de Perls, que marca ferro férrico para observar a transferência de ferro transplacentário, e, não constatamos a presença de ferro no placentônio, mas evidências morfológicas ao microscópio de luz e, principalmente, ao microscópio eletrônico de transmissão demonstraram hemácias maternas, sendo fagocitadas em diferentes graus de degradação, o que expõe o ferro para uso intracelular. Entretanto para comprovar a presença real de ferro, devemos realizar reação imunoistoquímica.

As áreas hemófagas da placenta de búfalas são achados ocasionais, ou seja, não ocorrem em todos os placentônios e conseqüentemente, em todas as lâminas analisadas ao microscópio óptico. Este fenômeno é semelhante ao que

ocorre na prenhez da vaca, fato que compartilhamos com LATSHAW (1987) e MYAGKAYA; VREELING-SINDERALOVA (1976).

De acordo com LEISER; ENDERS (1980a) e LEISER; ENDERS, (1980b), o conteúdo das áreas hemófagas na placenta da gata é composto de tecido uterino degenerado, sangue desintegrado, assim provendo o embriotrófo histolítico e hemolítico para este citotrofoblasto hemófago, achado também encontrado nossas amostras, cujo conteúdo na placenta de búfalas, apresentou hemácias extravasadas, plasma, debris celulares e células em “provável” processo de apoptose.

Na superfície apical das células trofoblásticas de búfalas, encontramos, ao microscópio eletrônico de transmissão, as cavéolas, que são vesículas endocíticas que possuem uma proteína integral de membrana característica, a caveolina. No caso da placenta, as cavéolas realizam intercâmbio de moléculas da mãe para o feto. Essas estruturas não são encontradas nas membranas de todas as células e, foram também descritas por ENDERS, HENDRICKX; SCHLAFKE, 1983; KING, 1976; PELKMANS; HELENIUS, 2002.

A reação de fosfatase ácida na placenta de búfalas foi positiva principalmente, tendo sido vista em maior abundância no mesênquima e trofoblasto, ao passo que na placenta de vaca, MURAI; YAMAUCHI (1986) detectaram essa enzima somente no trofoblasto da zona arcada.

As hemácias extravasadas na interface materno-fetal de búfalas estavam em vários graus de digestão intracelular, produzindo assim vários resíduos intracelulares que requer um longo tempo para a sua degradação total. O mesmo achado foi descrito por MURAI; YAMAUCHI (1986) na placenta bovina.

WIMSATT (1980) e ENRIQUEZ-YAP (1974) afirmaram que na placenta de ruminantes, ambas as células epiteliais trofoblásticas e as células binucleadas participam do processo de fagocitose de eritrócitos maternos extravasados. Já em nossas amostras de placentas de búfalas, só as células epiteliais trofoblásticas participaram da fagocitose de eritrócitos maternos.

As glândulas endometriais são importantes sítios de transferência de substâncias em muitas espécies animais, visto que elas produzem o chamado “leite uterino” que é composto de secreções que contém dentre outras substâncias, o ferro que é transportado pela uteroferrina. O epitélio dessas estruturas nas búfalas é colunar, com o núcleo basal, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, cromatina frouxa, presença de vesículas supranucleares associadas ao Golgi, da mesma forma que o observado em ruminantes por AITKEN et al., 1973; AITKEN, 1974; AITKEN, 1975; HOYES, 1972.

Realizamos as reações de fosfatase ácida nas glândulas endometriais de búfalas e constatamos que são positivas, isto significa que também realizam fagocitose além do placentônio. Este fato também foi observado por WISLOCKI; DEMPSEY (1946) na placenta de gatas.

Deste modo, nossa sugestão ao concluir este trabalho é a de propor novos métodos de estudo da morfologia placentária em ruminantes, comparando nossos dados da placentação de búfalas com a placentação de vacas no sentido de contribuir com as pesquisas na área de biotecnologia, e para complementação do entendimento do processo de placentação em ruminantes.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Após observação e descrição minuciosas da interação materno-fetal da placenta de búfalos, concluímos que:

- 1 As áreas hemófagas da placenta de búfalas foram encontradas nas amostras a partir dos 4 até os 10 meses de prenhez, e aparecem esporadicamente, não sendo encontradas em todos os placentônios coletados e, conseqüentemente, em todas as lâminas analisadas ao microscópio óptico;
- 2 As áreas hemófagas da placenta de búfalas não possuem formato definido;
- 3 O epitélio da “zona arcada” da placenta de búfalas, que compreende a região do topo dos vilos maternos que está em contato com a base dos vilos fetais, é um epitélio modificado, pois apresenta propriedades absortivas, fagocíticas e secretórias que possuem a função de nutrir o feto;
- 4 O conteúdo das áreas hemófagas da placenta de búfalas apresentou hemácias extravasadas, plasma, debris celulares e células em “provável” processo de apoptose;
- 5 A degradação das hemácias pelo trofoblasto da placenta de búfalas produz vários resíduos intracelulares, sugerindo que a digestão intracelular destas requer um longo tempo;

- 6 A presença de cavéolas na superfície das células epiteliais trofoblásticas sugere fortemente que nesta região haja absorção de substâncias por via endocítica;
- 7 As glândulas endometriais de búfalas são colunares com microvilos em seu ápice e possuem importante papel na secreção e transferência de substâncias da mãe para o feto;
- 8 A reação histoquímica positiva de “Perls” na glândula endometrial de búfalas indica que esta estrutura pode ser outra via de transferência de ferro para o feto, que não as áreas hemófagas que não mostraram positividade a esta reação provavelmente pelo fato do ferro estar em outra forma, que não a férrica;
- 9 O trofoblasto, o mesênquima dos placentônios e as glândulas endometriais de búfalas possuem atividade fagocítica, demonstrada pela reação histoquímica positiva de fosfatase ácida.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, M.; EL-NAGGAR, M. A. The biometry of the gravid uterus in egyptian buffalo cows. **Zentralblatt Veterinarmedizin A.**, v. 16, n. 9, p. 838-854, Nov. 1969.
- AITKEN, R. J.; BURTON, J.; HAWKINS, J.; KERR-WILSON, R.; SHORT, R. V.; STEVEN, D. H. Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer, *Capreolus Capreolus*, during delayed implantation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 481-493, 1973.
- AITKEN, R. J. Delayed implantation in the roe deer (*Capreolus capreolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 225-233, 1974.
- AITKEN, R. J. Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. **Journal of Anatomy**, v. 119, n. 2, p. 369-384, 1975.
- ANDERSON, R. G. W. The caveolae membrane system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 199-225, 1998.
- BAKER, E.; MORGAN, E. H. Placental iron transfer in the cat. **J. Physiol.**, v. 232, p. 485-501, 1973.
- BAKER, E. N.; BAKER, H. M.; KIDD, R. D. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. **Biochem. Cell Biol.**, v. 80, n. 1, p. 27-34, 2002.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. Edinburg : Churchill Livingstone, 1982. p. 257-386.
- BAZER, F. W.; WORTHINGTON-WHITE, D.; FLISS, M. S.; GROSS, S. Uteroferrin: a progesterone-induced hematopoietic growth factor of uterine origin. **Exp. Hematol.**, v. 19, n. 9, p. 1910-915, Nov. 1991.
- BIERINGS, M. B.; VAN EIJK, H. G.; BAERT, M. R. M.; VAN DIJK, H. P. Regulation of transferrin receptor expression in term human cytotrophoblasts. **Trophoblast Research**, v. 6, p. 237-248, 1992.
- BOGAIR, N. The Bessis reticular cell, the hemoglobin 'switch' and the role of fetal hemoglobin: a hypothesis. **Med Hypotheses**, v. 34, n. 2, p. 105-110, Feb. 1991.
- BJÖRKMAN, N.; SOLLÉN, P. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 1, p. 347-362, 1960.
- BURTON, G. J.; SAMUEL, C. A.; STEVEN, D. H.; Ultrastructural studies of the placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 61, p. 275-286, 1976.

CARVALHO, A. F. **Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalus bubalis bubalis*) – Linnaeus, 1758**. 2000. 110f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

CHANG, W. J.; YING, Y. S.; ROTHBERG, K. G.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J.; GAMBLIEL, H. A.; DE GUNZBURG, J.; MUMBY, S. M.; GILMAN, A. G.; ANDERSON, R. G. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. **J. Cell. Biol.**, v. 126, n. 1, p. 127-138, Jul. 1994.

CREED, R. F. S. & BIGGERS, J. D. Placental haemophagous organs in the *Procyonidae* and *Mustelidae*. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 8, p. 133-137, 1964.

DANTZER, V. Epitheliochorial placentation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v. 1.p. 18-28.

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. 103-109, 1984.

DOUGLAS, T. A.; RENTON, J. P.; WATTS, C.; DUCKER, H. A. Placental transfer of iron in the sow (*Sus domesticus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 43A, p. 665-671, 1972.

DUMARTIN, B.; CANIVENC, R. Ultrastructural study of endothelial permeability to macromolecules in fetal paraplacental capillaries of European badger. **Placenta**, v. 12, n. 6, p. 625-635, 1991.

DUMARTIN, B.; CANIVENC, R. Placental iron transfer regulation in the haemophagous region of the badger placenta: ultrastructural localization of ferritin in trophoblast and endothelial cells. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 185, n. 2, p. 175-179, 1992.

ENDERS, A. C.; HENDRICKX, A. G.; SCHLAFKE, S. Implantation in the rhesus monkey: initial penetration endometrium. **American Journal of Anatomy**, v. 167, p. 275-298, 1983.

ENRIQUEZ-YAP, E. L. The placentome of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*) In mid-pregnancy: a study to establish the basis of clinico-pathological analysis on the possible causes of early reproductive failures. **The Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v. 13, n. 1-2, p. 1-25, 1974.

FEITOSA-JÚNIOR, F. S. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em búfalos**. 1997. 237f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FLETCHER, J.; HUEHNS, E. R. Function to transferrin. **Nature**, v.218, n. 29, June 1968.

FONSECA, W. **Búfalo**: sinônimo de carne, leite, manteiga e trabalho. 4. ed. São Paulo: Ícone, 1986.

GAMBLING, L.; DANZEISEN, R.; GAIR, S.; LEA, R. G.; CHARANIA, Z.; SOLANKY, N.; JOORY, K. D.; SRAI, S. K. S.; McARDLE, H. J. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins *in vivo* and *in vitro*. **Biochem. J.**, v. 356, p. 883-889, 2001.

GOMORI, G. A microtechnical demonstration of iron. A criticism of its methods. **American Journal of Pathology**, v. XII, p. 655-665, 1936.

GRAY, C. A.; TAYLOR, K. M.; RAMSEY, W. S.; HILL, J. R.; BAZER, F. W.; BARTOL, F. F.; SPENCER, T. E. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1608-1613, 2001a.

GRAY, C. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311-1323, 2001b.

GULAMHUSEIN, A. P.; BECK, F. Development and structure of the extra-embryonic membranes of the ferret. A light microscopic and ultrastructural study. **J Anat.**, v. 120, n. 2, p. 349-365, Nov 1975.

HOSKINS, F. H.; HANSRAD, S. L. Placental transfer of iron in swine as a function of gestation age. **Proceedings Society in Experimental Biology and Medicine**, v. 116, p. 7-11, 1964a.

HOSKINS, F. H.; HANSRAD, S. L. Placental transfer and fetal tissue iron utilization in sheep. **J. Nutrition**, v. 83, p. 10-14, 1964b.

HOYES, A. D. The endometrial glands of the pregnant sheep: an ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v. 111, n. 1, p. 55-67, 1972.

KHATUN, R.; WU, Y.; KANENISHI, K.; UENO, M.; TANAKA, S.; HATA, T.; SAKAMOTO, H. Immunohistochemical study of transferrin receptor expression in the placenta of pre-eclamptic pregnancy. **Placenta**, v. 24, n. 8-9, p. 870-876, Sept.-Oct. 2003.

KICIC, A.; CHUA, A. C.; BAKER, E. The desferrithiocin (DFT) class of iron chelators: potential as antineoplastic agents. **Anticancer Drug Des.** v. 16, n. 4-5, p. 195-207, Aug.-Oct. 2001a.

KICIC, A.; CHUA, A. C.; BAKER, E. Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells. **Cancer**. v. 92, n. 12, p. 3093-3110, 2001b.

KICIC, A.; CHUA, A.C.; BAKER, E. Desferrithiocin is a more potent antineoplastic agent than desferrioxamine. **Br J Pharmacol.**, v. 135, n. 6, p. 1393-1402, Mar. 2002.

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

KING, B. F.; ENDERS, A. C.; WIMSATT, W. A. The annular hematoma of the shrew yolk-sac placenta. **American Journal of Anatomy**, v. 152, p. 45-58, 1978.

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

LATSHAW, W. K. **Veterinary developmental anatomy**. A clinically oriented approach. Toronto: B.C. Becker, 1987. 283 p.

LAWN, A. M.; CHIQUOINE, A. D.; AMOROSO, E. C. The development of the placenta in the sheep and goat: an electron microscope study. **Journal of Anatomy**, v. 105, n. 3, p. 557-578, 1969.

LEIMBERG, J. M.; KONIJN, A. M.; FIBACH, E. Developing human erythroid cells grown in transferrin-free medium utilize iron originating from extracellular ferritin. **American Journal of Hematology**, v. 73, p. 211-212, 2003.

LEISER, R.; ENDERS, A. C. Light and electron microscopy study of the near-term paraplacenta of the domestic cat I. Polar zone and paraplacental junctional areas. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 106, p. 293-311, 1980a.

LEISER, R.; ENDERS, A. C. Light and electron microscopy study of the near-term paraplacenta of the domestic cat II. Paraplacental hematoma. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 106, p. 312-326, 1980b.

LEISER, R.; EGLOFF, T. Ultrastructural correlates of placental substance transfer: a state-of-art-review. **Placental communications: biochemical, morphological and cellular aspects**, v. 199, p. 219-238, 1990.

LEISER, R.; WILLE, K. H. Cytochemical establishment of acid phosphatase in the bovine endometrium and trophoblast during implantation. **Anatomy and Embryology**, v. 148, n. 2, p. 159-173, Dec. 1975.

LINDER, M. C.; ZEROUNIAN, N. R.; MORIYA, M.; MALPE, R. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. **BioMetals**, v. 16, p. 145-160, 2003.

McARDLE, H. J.; DANZEISEN, R.; FOSSET, C.; GAMBLING, L. The role of the placenta in iron transfer from mother to fetus and the relationship between iron status and fetal outcome. **BioMetals**, v. 16, p. 161-167, 2003.

MEYRON-HOLTZ, E. G.; VAISMAN, B.; VAISMAN, Z. I.; CABANTCHIK, E.; FIBACH, E.; ROUAULT, T. A.; HERSHKO, C.; KONIJN, A. M. Regulation of intracellular iron metabolism in human erythroid precursors by internalized extracellular ferritin. **Blood**, v. 94, n. 9, p. 3205-3211, Nov. 1999.

MICHEL, G. Structure of the placenta in bears. **Anat. Anz.**, v. 155, n. 1-5, p. 209-215, 1984.

MIGLINO, M. A. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta de bovinos.** 1991. 303f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 53-56, 2002.

MYAGKAYA, G.; VREELING-SINDELAROVA, H. Erythrophagocytosis by cells of the trophoblastic epithelium in the sheep placenta in different stages of pregnancy. **Acta Anatomica**, v. 95, p. 234-248, 1976.

MYAGKAYA, G.; SCHELLENS, J. P. M.; VREELING - SINDELÁROVÁ, H. Lysosomal breakdown of erythrocytes in the sheep placenta. **Cell and Tissue Research**, v. 197, p. 79-94, 1979.

MYAGKAYA, G.; SCHELLENS, J. P. M. Final stages of erythrophagocytosis in the sheep placenta. **Cell Tissue Research**, v. 214, p. 501-518, 1981.

MYAGKAYA, G. L.; DE BRUIJN, W. C. Ferritin in chorionic villi of the sheep placenta. **Bibliotheca Anatomica**, n. 22, p. 117-122, 1982.

MYAGKAYA, G. L.; SCHONARGEL, 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, Nov.-Dec. 1984.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes.** New Brunswick: Rutgers University Press, 1987. 383 p.

MURAI, T.; YAMAUCHI, S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placentome. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 1, p. 74-87, 1986.

NANDAKUMARAN, M.; DASHTI, H. M.; AL-ZAID, N. S. Maternal-fetal transport kinetics of copper, selenium, magnesium and iron in perfused human placental lobule: in vitro study. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 231, p. 9-14, 2002.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, v. 3, p. 311-320, 2002.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A. F.; BEVILACQUA, E. Development of placenton in water buffalo (*Bubalus bubalis* – Linnaeus 1758). **Buffalo Journal**, v. 17, n. 2, p. 217-229, 2001.

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, p. 253-258, 1985.

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

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

ROTHBERG, K. G.; HEUSER, J. E.; DONZELL, W. C.; YING, Y. S.; GLENNEY, J. R.; ANDERSON, R. G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell**, v. 68, n. 4, p. 673-682, Feb. 1992.

ROY, K. S.; SAIGAL, R. P. Histoenzymic study on the uterus and early placentome of the sheep. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, n. 7, p. 695-699, July. 1987.

SANTOS, R. L.; BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES Jr., A. P.; ANDRADE, J. S. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. **Theriogenology**, v. 46, p. 1077-1083, 1996.

SEAL, U.; SINHA, A. A.; DOE, R. P. Placental iron transfer: relationship to placental anatomy and phylogeny of the mammals. **American Journal of Anatomy**, v. 134, p. 263-269, 1972.

SCHRÖDER, H. J. Comparative aspects of placental exchange functions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 63, p. 81-90, 1995.

TRINDER, D.; BAKER, E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 2, p. 292-296, Mar. 2003.

VALLET, J. L.; CHRISTENSON, R. K.; MCGUIRRE, W. J. Association between uteroferrin, retinol-binding protein, and transferrin within the uterine and conceptus compartments during pregnancy in swine. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1172-1178, 1996.

VANDERPUYE, O. A.; KELLEY, L. K.; SMITH, C. H. Transferrin receptors in the basal plasma membrane of the human placental syncytiotrophoblast. **Placenta**, v. 7, p. 391-493, 1986.

VAN DIJK, J. P. Regulatory aspects of placental iron transfer – a comparative study. **Placenta**, v. 9, p. 215-226, 1988.

VERRIJT, C. E. H.; KROOS, M. J.; HUIJSKES-HEINS, M. I. E.; VAN EIJK, H. G.; VAN DIJK, J. P. Non-transferrin iron uptake by trophoblast cells in culture. Significance of a NADH-dependent ferriductase. **Placenta**, v. 19, p. 525-530, 1998.

ZELLER, U.; KUHN, H-J. Postpartum erythrophagocytosis, iron storage and iron secretion in the endometrium of the tree shrew (*Tupaia*) during pregnancy. **J. Anat.**, v. 184, p. 597-606, 1994.

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

WIMSATT, W. A. New histological observations on the placenta of the sheep. **American Journal of Anatomy**, v. 87, p. 391-458, 1950.

WIMSATT WA, GOPALAKRISHNA A. Occurrence of a placental hematoma in the primitive sheath-tailed bats (Emballonuridae), with observations on its structure, development and histochemistry. **American Journal of Anatomy**, v. 103, n. 1, p. 35-67, July. 1958.

WIMSATT, W. A. Observations on the morphogenesis cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 2, p. 209-243, 1980.

WISLOCKI, G. B. The placentation of an antelope (*Rhynchotragus kirkii nyikae heller*). **American Journal of Anatomy**, v. 81, n. 2, p. 221-241, 1941.

WISLOCKI, G. B.; DEMPSEY, E. W. Histochemical reactions in the placenta of the cat. **American Journal of Anatomy**, v. 78, p. 1-37, n. 1, Jan. 1946.

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

Water buffalo. Disponível em: <<http://ww2.netnitco.net/users/djligda/wbfacts.htm>>. Acesso em: 12 out. 2002.